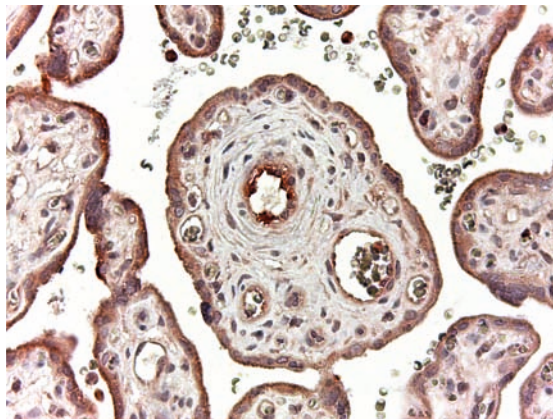


Die Rolle von Steroidsulfattransportern für die humane plazentare Östrogensynthese

Helene Schweigmann



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Ernst Petzinger

Die Rolle von Steroidsulfattransportern für die humane plazentare Östrogensynthese

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Helene Schweigmann

Tierärztin aus Darmstadt

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Ernst Petzinger
Prof. Dr. Gerhard Schuler

Tag der Disputation: 3. Juli 2014

Inhaltsverzeichnis

Publikationsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Vorsätze im Dezimalsystem.....	X
1 Literaturübersicht	1
1.1 Die humane Plazenta	1
1.1.1 Funktion der Plazenta	1
1.1.2 Aufbau der Plazenta.....	2
1.2 Östrogene während der Schwangerschaft des Menschen.....	4
1.2.1 Das Zusammenspiel von sulfatierten Steroiden und der Sulfatase in der Sexualhormon-Synthese	4
1.2.2 Syntheseweg von Östrogenen in der humanen Plazenta	6
1.2.3 Konzentration von Steroidsulfaten während der Schwangerschaft	9
1.2.4 Konzentration von Östrogenen während der Schwangerschaft	11
1.2.5 Die Rolle von Östrogenen während der Schwangerschaft.....	12
1.2.6 Das „Schwangerschaftshormon“ Estriol	14
1.3 Östrogene während der Trächtigkeit von Tieren.....	15
1.3.1 Pferd	15
1.3.2 Rind und Schwein	16
1.3.3 Hund	16
1.4 Die Familie der SLC10-Transporter.....	16
1.4.1 Überblick über die SLC10-Familie.....	17
1.4.2 Die Gallensäuretransporter NTCP (SLC10A1) und ASBT (SLC10A2).....	17
1.4.3 Der Steroidsulfattransporter SOAT (SLC10A6)	19
1.5 Die Familie der SLCO-Transporter	21
1.5.1 Eigenschaften der SLCO-Familie	21
1.5.2 OATPs in der humanen Plazenta	22
1.5.3 OATP2B1 (<i>SLCO2B1</i>) für die lokale Östrogenbereitstellung	23
1.6 Die Familie der SLC22-Transporter.....	24
1.6.1 Überblick über die SLC22-Familie.....	24
1.6.2 OAT4 (SLC22A11) als Anionenaustauscher in Niere und Plazenta.....	24
1.7 Die Chorionkarzinomzelllinie JEG-3	27
1.8 Zielsetzung.....	28
2 Material	29
2.1 Zellkultur	29
2.1.1 Zelllinien.....	29
2.1.2 Vektoren	30
2.1.3 Zellkulturmedien und -lösungen	32
2.1.4 Antibiotika	33
2.2 Antikörper.....	33
2.3 Enzyme	34
2.3.1 Polymerasen	34
2.3.2 Restriktionsenzyme.....	34
2.3.3 DNasen und RNasen	35

2.4	Real-Time qRT-PCR	35
2.5	Kits	36
2.6	Kommerziell erhältliche Puffer, Lösungen und Reagenzien	36
2.7	Chemikalien und Substanzen	37
2.8	Radioaktiv markierte Substanzen	39
2.9	Geräte	39
2.10	Verbrauchsmaterial	41
2.11	„Rezepte“ für hergestellte Puffer und Lösungen	42
2.11.1	Ethanolpräzipitation	42
2.11.2	Agarose-Gelelektrophorese	42
2.11.3	Transformation kompetenter Zellen	43
2.11.4	RNA-Isolierung	43
2.11.5	DNA-Isolierung	43
2.11.6	β -Galactosidase-Assay	44
2.11.7	Transportmessungen an Zellen	45
2.11.8	Proteinbestimmung	46
2.11.9	Immunfluoreszenz	46
2.11.10	Western Blot	47
2.11.11	Immunhistochemie	49
2.11.12	In-situ-Hybridisierung	50
3	Methoden	53
3.1	DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmungen	53
3.2	Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA	53
3.3	Phenol-Chloroform-Extraktion	53
3.4	Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren	54
3.5	Transformation kompetenter Zellen und Aufreinigung von Plasmid-DNA	54
3.5.1	Transformation	54
3.5.2	Aufreinigung von Plasmid-DNA im Midi-Maßstab	55
3.6	Isolierung von RNA	55
3.6.1	Gesamt-RNA-Isolierung aus Zellen	56
3.6.2	Gesamt-RNA-Isolierung aus LACP-Proben	56
3.7	cDNA-Synthese	57
3.7.1	cDNA-Synthese aus Zell-RNA	57
3.7.2	cDNA-Synthese aus LACP-RNA	58
3.8	Isolierung von DNA aus Zellen	59
3.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	60
3.9.1	PCR	61
3.9.2	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	61
3.9.3	Real-Time quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR)	63
3.10	Agarose-Gelelektrophorese	65
3.11	Zellbiologische Methoden	65
3.11.1	Kultivierung und Passagieren von Zellen	65
3.11.2	Auszählen und Aussäen von Zellen	66
3.11.3	Einfrieren von Zellen	66
3.11.4	Auftauen von Zellen	66
3.11.5	Herstellung von DCC-FKS	67

3.12	Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen	67
3.12.1	Generierung einer FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinie	68
3.12.2	β -Galactosidase-Assay	68
3.12.3	Generierung von stabil mit Transportern transfizierten JEG-3-Zellen	70
3.13	Transportmessungen mittels Flüssigszintillationsmessung	71
3.13.1	Versuchsvorbereitung	71
3.13.2	Aufnahmemessung	71
3.13.3	IC ₅₀ -Messungen	72
3.13.4	Flüssigszintillationsmessung	72
3.13.5	Proteinbestimmung nach Lowry	72
3.13.6	Auswertung der Transportmessungen.....	73
3.14	Transportmessungen mittels Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS-MS)	73
3.14.1	Versuchsvorbereitung	73
3.14.2	Aufnahmemessung	74
3.14.3	LC-MS-MS-Messung.....	74
3.14.4	Proteinbestimmung mit dem BCA-Assay.....	74
3.14.5	Auswertung der Transportmessungen.....	74
3.15	Metabolismusmessungen.....	75
3.16	Immunfluoreszenz	75
3.17	Western Blot.....	76
3.17.1	Proteinextraktion aus Zellen.....	76
3.17.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	77
3.17.3	Proteintransfer (Gel-Blot)	78
3.17.4	Blockieren der Blotting-Membran und Antikörperreaktion.....	79
3.17.5	Detektion.....	79
3.17.6	Stripping.....	80
3.18	Anfertigen histologischer Präparate.....	80
3.18.1	Anfertigen von Schnitten	80
3.18.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.).....	80
3.19	Immunhistochemie	81
3.20	Laser-assisted cell picking (LACP)	82
3.20.1	Herstellung der Präparate	82
3.20.2	Gewinnung der Proben mittels LACP	83
3.21	In-situ-Hybridisierung	83
3.21.1	Herstellung der Sonde	83
3.21.2	Durchführung der In-situ-Hybridisierung.....	84
4	Ergebnisse	87
4.1	Lokalisation von SOAT in der humanen Plazenta.....	87
4.1.1	Nachweis von SOAT-mRNA mittels Laser-assisted cell picking (LACP) und In-situ-Hybridisierung	87
4.1.2	Immunhistochemischer Nachweis des SOAT-Proteins.....	89
4.2	Identifizierung der Transporter für 16 α -OH-DHEAS.....	91
4.2.1	Darstellung der Genexpression von stabil mit Transportern transfizierten HEK293-Zelllinien	91
4.2.2	Aufnahmemessungen mit 16 α -OH-DHEAS.....	92
4.2.3	Hemmstudien mit 16 α -OH-DHEAS	95
4.3	JEG-3-Zellen als Plazentamodell - Untersuchung von nativen JEG-3-Zellen.....	97
4.3.1	Expressionsprofil nativer JEG-3-Zellen	97
4.3.2	Aufnahme von sulfatierten Steroiden in nativen JEG-3-Zellen.....	98

4.4	Stabile Transfektion von JEG-3-Zellen mit Steroidsulfattransportern	99
4.4.1	Generierung einer FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinie	99
4.4.2	Generierung von stabil mit Transportern transfizierten JEG-3-Zelllinien	102
4.4.3	Aufnahmemessungen an stabil mit Transportern transfizierten JEG-3-Zelllinien	106
4.5	Metabolismusmessungen an JEG-3-Zellen	108
4.5.1	Metabolismus von nativen JEG-3-Zellen	108
4.5.2	Metabolismus von stabil mit Transportern transfizierten JEG-3-Zelllinien	109
5	Diskussion.....	115
5.1	SOAT in der humanen Plazenta	115
5.1.1	Lokalisation von SOAT	115
5.1.2	Physiologische Bedeutung von SOAT in der Plazenta	116
5.2	Transport des Estriol-Vorläufers 16 α -OH-DHEAS	118
5.2.1	Transporteigenschaften der getesteten Transporter	118
5.2.2	Überlegungen zur Bedeutung des Steroidsulfattransports für die hohe plazentare Estriolsynthese	121
5.3	Steroidsulfattransporter in JEG-3-Zellen	122
5.3.1	Expressionsprofil	122
5.3.2	Transport von Steroidsulfaten	123
5.4	Stabile Transfektion von JEG-3-Zellen mit Steroidsulfattransportern	124
5.4.1	SOAT-JEG-3-Zellen	124
5.4.2	OATP2B1-JEG-3-Zellen	126
5.4.3	Bewertung der stabilen Transfektion von JEG-3-Zellen	126
5.5	Metabolismusmessungen an JEG-3-Zellen	127
5.5.1	Metabolismus von nativen JEG-3-Zellen	128
5.5.2	Metabolismus von stabil mit Transportern transfizierten JEG-3-Zellen	133
5.5.3	Bewertung der Versuchsergebnisse	136
5.6	16 α -Hydroxylasen in JEG-3-Zellen und der humanen Plazenta	138
5.7	CYP17 in JEG-3-Zellen und der humanen Plazenta	139
5.7.1	Bisheriges Verständnis zur CYP17-Expression der Plazenta	139
5.7.2	Neue Erkenntnisse zur CYP17-Expression	140
5.7.3	Rolle von CYP17 in der Plazenta	141
6	Zusammenfassung	143
7	Summary	144
8	Literaturverzeichnis	146
9	Danksagungen	163

Publikationsverzeichnis

Paper

Schweigmann H, Sánchez-Guijo A, Ugele B, Hartmann K, Hartmann MF, Bergmann M, Pfarrer C, Wudy SA, Petzinger E, Geyer J, Grosser G (2014) Transport of the placental estriol precursor 16 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone sulfate (16 α -OH-DHEAS) by stably transfected OAT4-, SOAT-, and NTCP-HEK293 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 143:259-265.

Poster

Schweigmann H, Grosser G, Galuska CE, Hartmann MF, Alber J, Ugele B, Wudy SA, Geyer J, Petzinger E (2012) Characterization of JEG-3 cells as *in vitro* model for the role of steroid sulfate transporters for placental estrogen synthesis.

55. *Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Mannheim; 07.-10.03.2012.*

Abstract-CD 55, ISSN 1862-1503.

Dieses Poster wurde mit einem Posterpreis ausgezeichnet.

Grosser G, **Schweigmann H**, Galuska CE, Hartmann MF, Alber J, Funk K, Ugele B, Wudy SA, Geyer J, Petzinger E (2012) Role of the sodium-dependent organic anion transporter (SOAT) for placental estrogen synthesis.

78. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Dresden; 19-22.03.2012.*

Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 385 (1): 31.

Schweigmann H, Grosser G, Galuska CE, Hartmann MF, Ugele B, Wudy SA, Geyer J, Petzinger E (2012) JEG-3 cells as *in vitro* model for studies on placental steroid sulfate uptake and estrogen biosynthesis.

8. *Transport Colloquium im Schloss Rauischholzhausen, Rauischholzhausen; 17.-18.05.2012.*

Schweigmann H, Grosser G, Galuska CE, Hartmann MF, Ugele B, Wudy SA, Geyer J, Petzinger E (2012) Steroid sulfate uptake and estrogen biosynthesis in the human placenta.

5. *Jahrestagung des International Giessen Graduate Centre for the Life Sciences (GGL), Giessen; 18.-19.09.2012.*

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Schema der humanen Plazenta	2
Abb. 1.2:	Querschnitt durch eine Chorionzotte	3
Abb. 1.3:	Strukturformeln der sulfatierten Östrogenvorstufen und der Östrogene	7
Abb. 1.4:	Syntheseweg von Östrogenen in der humanen Plazenta	9
Abb. 3.1:	Prinzip der Real-Time qRT-PCR mit TaqMan-Sonden	63
Abb. 3.2:	Vereinfachte Darstellung des Flp-In-Systems von Invitrogen	70
Abb. 3.3:	Aufbau eines Semi-Dry-Elektroblot-Gelsandwiches	78
Abb. 4.1:	LACP aus humaner Plazenta vom dritten Trimester	88
Abb. 4.2:	In-situ-Hybridisierung von SOAT-mRNA in humaner Plazenta aus dem dritten Trimester	89
Abb. 4.3:	Immunhistochemische Lokalisierung von SOAT in humaner Plazenta aus dem dritten Trimester	90
Abb. 4.4:	Überprüfung der Expression von stabil transfizierten SOAT-, OAT4-, OATP2B1-, NTCP- und ASBT-HEK293-Zellen sowie FlpIn-HEK293-Zellen mittels qRT-PCR	92
Abb. 4.5:	Aufnahme von 16 α -OH-DHEAS in stabil transfizierten OAT4-, SOAT-, NTCP-, OATP2B1- und ASBT-HEK293-Zellen	93
Abb. 4.6:	Konzentrationsabhängige Aufnahme von 16 α -OH-DHEAS in OAT4-, SOAT- und NTCP-HEK293-Zellen	94
Abb. 4.7:	Hemmung der [3 H]DHEAS-Aufnahme in OAT4-, SOAT-, und NTCP-HEK293-Zellen durch 16 α -OH-DHEAS	96
Abb. 4.8:	Expressionsprofil nativer JEG-3-Zellen	98
Abb. 4.9:	Aufnahme von [3 H]DHEAS und [3 H]E $_1$ S in nativen JEG-3-Zellen	99
Abb. 4.10:	Überprüfung der FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinien	102
Abb. 4.11:	Übersicht und Nomenklatur über die verwendeten JEG-3-Zelllinien	103
Abb. 4.12:	Genexpression stabil transfizierter SOAT-, OATP2B1- und OAT4-JEG-3-Zellen	104
Abb. 4.13:	Western Blot von stabil transfizierten SOAT-JEG-3-Zellen	105
Abb. 4.14:	Immunfluoreszenz von stabil transfizierten SOAT-JEG-3-Zellen	106
Abb. 4.15:	Aufnahme von [3 H]DHEAS und [3 H]E $_1$ S in stabil transfizierten SOAT- und OATP2B1-JEG-3-Zellen	107
Abb. 4.16:	Aufnahme von [3 H]DHEAS und [3 H]E $_1$ S in stabil transfizierten OAT4-JEG-3-Zellen	107
Abb. 4.17:	Metabolismus von DHEAS, DHEA und 16 α -OH-DHEAS in nativen JEG-3-Zellen	108
Abb. 4.18:	Metabolismus von DHEAS und DHEA in SOAT-, OATP2B1-JEG-3- und JEG-3-FRT-Zellen	111
Abb. 4.19:	Metabolismus von E $_1$ S in SOAT- und OATP2B1-JEG-3- sowie JEG-3-FRT-Zellen	113

Abb. 5.1:	Schematische Darstellung des vermuteten Zusammenspiels von Steroidsulfattransportern und der Synthese von Östrogenen in der humanen Plazenta	120
Abb. 5.2:	Syntheseweg von Estradiol	129
Abb. 5.3:	Umsatzgeschwindigkeiten der Sulfatase und Aromatase in Abhängigkeit von der Substratkonzentration in humanen Plazentamikrosomen	130
Abb. 5.4:	Hypothese zur Estradiolsynthese in SOAT-JEG-3-Zellen	135
Abb. 5.5:	Steroidhormonsynthese aus Cholesterol durch CYP17	141

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Konzentrationen der sulfatierten Steroide DHEAS, 16 α -OH-DHEAS und E ₁ S im Nabelblut und im maternalen Blut des Menschen	10
Tab. 1.2:	Konzentrationen von Estron, Estradiol, Estriol und Estetrol gegen Ende der Schwangerschaft des Menschen	11
Tab. 4.1:	Kinetische Parameter der 16 α -OH-DHEAS-Aufnahme in OAT4-, SOAT- und NTCP-HEK293-Zellen	94
Tab. 4.2:	Metabolisierung von DHEAS durch stabil transfizierte SOAT- und OATP2B1-JEG-3-Zellen sowie JEG-3-FRT-Zellen	112
Tab. 4.3:	Metabolisierung von E ₁ S durch stabil transfizierte SOAT- und OATP2B1-JEG-3-Zellen sowie JEG-3-FRT-Zellen	114
Tab. 5.1:	Vergleich der kinetischen Parameter zwischen 16 α -OH-DHEAS und DHEAS in OAT4-, SOAT-, NTCP-, und OATP2B1-HEK293 Zellen	119

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
[³ H]	Tritium
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
APS	Ammoniumpersulfat
ASBT	Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporter
BCA	Bicinchoninsäure
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BSEP	Bile Salt Export Pump
BSP	Bromosulfophthalein
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
Ci	Curie
C _T	Signal threshold cycle (Schwellenwert-Zyklus)
CYP11A1	Cholesterol- <i>side-chain-cleavage</i> -Enzym, P450 _{scc}
CYP17	17α-Hydroxylase/17,20-Lyase, CYP17A1
CYP19A1	Aromatase
CYP3A4	Cytochrom P450 3A4
CYP3A7	Cytochrom P450 3A7, 16α-Hydroxylase
Da	Dalton
DAPI	4', 6'-Diamidine-2'-Phenylindol Dihydrochlorid
DCC	Dextran Coated Charcoal (Aktivkohle)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest. H ₂ O	destilliertes Wasser
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteron-3-sulfat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
dpm	Disintegration per minute (Zerfall pro Minute)
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E ₁	Estron
E ₁ S	Estron-3-sulfat
E ₂	Estradiol
E ₂ S	Estradiol-3-sulfat
E ₃	Estriol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FKS	Fetales Kälberserum
FRT	Flp Recombinase Target
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GOI	Gene of interest
GST	Gonad-specific Transporter
h	Stunde
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
hCG	humanes Choriongonadotropin

HEK	Human embryonic kidney
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HRP	Horse radish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
Hum.	human
IC ₅₀	Konzentration eines Inhibitors, der eine halbmaximale Inhibition hervorruft
IUGR	Intrauterine Growth Restriction (Intrauterine Wachstumsretardierung)
K _m	Michaeliskonstante
l	Liter
LACP	Laser-assisted cell picking
LB	Luria Bertani
LC-MS-MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie)
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoprotein geringer Dichte)
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
MGB	Minor Groove Binder
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MRP	Multidrug Resistance-associated Protein
mSoat	muriner Sodium-dependent organic anion transporter
MW	Mittelwert
n. B.	nach Bedarf
n.d.	nicht detektierbar
NBT/BCIP	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
ns	nicht signifikant
NTB	NaCl ₂ -Tris-Puffer
NTCP	Na ⁺ /Taurocholate Cotransporting Polypeptide (human)
OAT	Organic Anion Transporter (human)
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptide (human)
OCT	Organic Cation Transporter (human)
OCTN	Organic Zwitterion/Cation Transporter bzw. Novel Organic Cation Transporter (human)
OD	Optische Dichte
OH	Hydroxy-/Hydroxylgruppe
ONP	o-Nitrophenol
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid
OSCP	Organic Solute Carrier Protein (human)
OST	Organic Solute Transporter (human)
P450 _{scc}	Cholesterol- <i>side-chain-cleavage</i> -Enzym, CYP11A1
PAH	<i>para</i> -Aminohippursäure
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBSM	Phosphate Buffered Saline mit MgCl ₂
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ /H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration
PREGS	Pregnenolon-3-sulfat
qRT-PCR	Real-Time quantitative Reverse Transkriptase-PCR
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SDS	Sodiumdodecylsulfat

SE	Standard Error (Standardfehler)
SLC	Solute Carrier
SLCO	Solute Carrier Organic Anion
SMP	Sulfooxymethylpyren
SOAT	Sodium-dependent Organic Anion Transporter (human)
SSC	Saline Sodium Citrate
SSW	Schwangerschaftswoche
SULT	Sulfotransferase
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS-T	Tris-Buffered Saline mit Tween 20
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TetO ₂	Tetrazyklin Operator 2
T _m	Schmelztemperatur
TNMT	Tris-NaCl-MgCl ₂ -Triton-X-100-Lösung
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
V _{max}	Maximale Aufnahme-/Umsatzgeschwindigkeit

In dieser Arbeit werden humane Transporter in Großbuchstaben abgekürzt (z. B. SOAT), tierische Transporter werden in Kleinbuchstaben mit vorangestellter Kennzeichnung der Tierart dargestellt (mSoat für muriner Soat).

Vorsätze im Dezimalsystem

Symbol	Potenz	Name
f	10 ⁻¹⁵	Femto
p	10 ⁻¹²	Piko
n	10 ⁻⁹	Nano
μ	10 ⁻⁶	Mikro
m	10 ⁻³	Milli
k	10 ³	Kilo

1 LITERATURÜBERSICHT

Während der Schwangerschaft des Menschen werden hohe Mengen an Östrogenen produziert, die ab der 9. Schwangerschaftswoche hauptsächlich von der Plazenta synthetisiert werden. Dabei benutzt sie sulfatierte Vorstufen wie Dehydroepiandrosteron-3-sulfat (DHEAS), die über Transporter in die hormonproduzierenden Zellen der Plazenta aufgenommen werden (Albrecht und Pepe 1990; Ugele et al. 2003). Bei diesen Zellen handelt es sich um ein Synzytium, genannt Synzytiotrophoblast, das die plazentaren Zotten bedeckt und den Austausch von Stoffen zwischen dem maternalen und fetalen Kompartiment bestimmt. In dieser Arbeit stehen die Transporter im Mittelpunkt, die die Aufnahme der sulfatierten Steroide in den Synzytiotrophoblasten vermitteln. In der Einleitung wird ein Überblick über Funktion und Aufbau der humanen Plazenta gegeben (Kapitel 1.1) und die Östrogensynthese während der Schwangerschaft des Menschen und der Trächtigkeit bei Tieren erläutert (Kapitel 1.2 und 1.3). Anschließend werden die relevanten Steroidsulfattransporter beschrieben (Kapitel 1.4–1.6) und die Chorionkarzinomzelllinie JEG-3 vorgestellt, die als Modell für humane Trophoblastenzellen herangezogen wurde (Kapitel 1.7).

1.1 Die humane Plazenta

1.1.1 Funktion der Plazenta

Die Plazenta stellt die Verbindung zwischen Fetus und Mutter dar und verankert den Fetus an der Uteruswand. Über sie erfolgt der Stoff- und Gasaustausch, so dass Nährstoffe aus dem mütterlichen Blut dem Fetus zugeführt werden, während Ausscheidungsstoffe des Fetus in den maternalen Kreislauf überführt werden. Zudem fungiert sie als endokrines Organ und produziert humanes Plazentalaktogen, humanes Choriongonadotropin (hCG), Progesteron und Östrogene (Strauss et al. 1996). Humanes Plazentalaktogen bewirkt eine erhöhte Insulinresistenz der maternalen Zellen und steigert somit den Blutzuckerspiegel, was der Versorgung des Fetus mit Glucose zugutekommt. Zudem bewirkt die Zunahme an Insulin eine vermehrte Proteolyse und Lipolyse, so dass der Fetus mit den freiwerdenden Aminosäuren, Fettsäuren und Ketonen versorgt werden kann. Das Hormon hCG dient dem Erhalt des Gelbkörpers (Corpus luteum graviditatis) und stimuliert damit in der frühen Schwangerschaft die Synthese des schwangerschaftserhaltenden Hormons Progesteron. hCG steigt schon wenige Tage nach der Befruchtung an und dient im Blut oder Urin dem Nachweis einer Schwangerschaft. Allmählich übernimmt die Plazenta die Progesteronsynthese und stellt ab der 6.-8. Schwangerschaftswoche die Hauptprogesteronquelle dar. Progesteron ist essentiell für den Erhalt der Schwangerschaft,

denn es verhindert durch seinen immunsuppressiven Effekt eine Abstoßung des genetisch fremden Embryos und bewirkt eine Ruhigstellung des Myometriums, so dass der Embryo ungestört wachsen kann (Albrecht und Pepe 1990; Kleinstein und Gips 2000). Die Gruppe der Östrogene wird in Kapitel 1.2 näher erläutert, da sie in dieser Arbeit von besonderer Bedeutung ist.

1.1.2 Aufbau der Plazenta

Die Entwicklung der Plazenta beginnt mit der Implantation der Blastozyste in die Uteruswand. Die äußeren Zellen der Blastozyste werden als Trophoblasten bezeichnet und sind wesentlich am Aufbau der Plazenta beteiligt. Die innen gelegenen Vorgängerzellen des Embryos werden als Embryoblast bezeichnet. Zunächst verschmelzen einige Trophoblastenzellen zu einem Synzytium, dem Synzytiotrophoblasten. Dieser wächst invasiv in das Endometrium der Gebärmutter ein. Die verbleibenden, sich weiter teilenden Trophoblastenzellen werden als Zytotrophoblasten bezeichnet und stellen ein Reservoir für sich neu bildende Synzytiotrophoblasten dar. Beim Eindringen in das endometriale Gewebe baut der Synzytiotrophoblast das mütterliche Bindegewebe proteolytisch ab. Die Endometriumzellen vergrößern sich, lagern Fett und Glykogen ein und werden in dieser veränderten Form als Deziduazellen bezeichnet. Durch fortschreitendes Eindringen des Synzytiotrophoblasten in die Uteruswand kommt es schließlich zum Abbau des mütterlichen Gefäßendothels, so dass das mütterliche Blut direkt an den Synzytiotrophoblasten angrenzt. Dieser bildet sich zu Chorionzotten mit bindegewebigem Grundstock aus, die vom maternalen Blut umspült werden (Junqueira und Carneiro 1996; Gude et al. 2004).

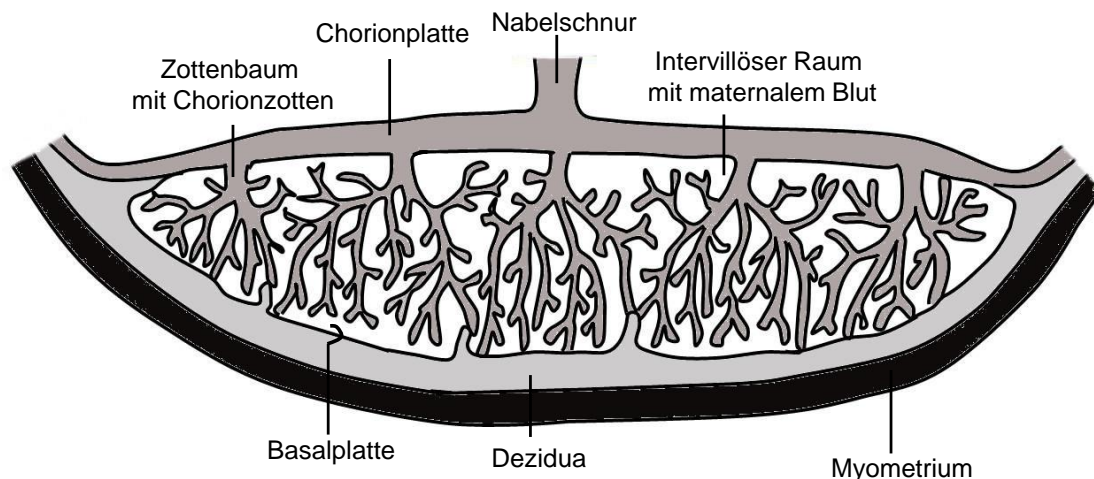


Abb. 1.1: Schema der humanen Plazenta

Die Begrenzung der Plazenta wird von der Chorionplatte auf der fetal Seite und der Basalplatte auf der maternalen Seite gebildet. Dazwischen ragen die Chorionzotten in den intervillösen, mit maternalem Blut gefüllten Raum und vermitteln den Austausch von Stoffen zwischen maternalem und fetalem Blut. Oberhalb dieser Abbildung wäre der Fetus lokalisiert, der sich innerhalb der Amnionhöhle befindet und über die Nabelschnur mit der Plazenta verbunden ist.

Der mit Blut gefüllte Raum zwischen den Zotten wird als intervillöser Raum bezeichnet. Umrahmt werden die Plazentazotten auf der dem Fetus zugewandten Seite von der Chorionplatte, die die Basis der Zotten darstellt, und auf der maternalen Seite von der Basalplatte, die direkt mit der Uteruswand verbunden ist (Abb. 1.1). Aufgrund des direkten Kontaktes des Blutes mit dem Chorion wird dieser Plazentatyp als Plazenta hämochorialis bezeichnet.

Der Stoff- und Gasaustausch zwischen Mutter und Fetus findet über die in den maternalen Blutraum ragenden Chorionzotten statt (Abb. 1.2). Sie enthalten einen bindegewebigen Grundstock mit fetalen Blutgefäßen und sind vom Synzytiotrophoblasten bedeckt, der nicht nur den Austausch zwischen den im fetalen und maternalen Blut gelösten Stoffen vermittelt, sondern auch die Synthese von den oben beschriebenen Hormonen (humanes Plazentalaktogen, hCG, Progesteron, Östrogene) übernimmt. Die Zytotrophoblasten stellen die Vorgängerzellen des Synzytiotrophoblasten dar und befinden sich unterhalb des Synzytiums, bevor sie schließlich durch Fusion mit ihm selbst Teil des Synzytiotrophoblasten werden. Während im ersten Trimester noch relativ viele Zytotrophoblasten vorhanden sind, nimmt die Anzahl durch Fusion mit den Synzytiotrophoblasten im Verlauf der Schwangerschaft stetig ab (Junqueira und Carneiro 1996; Gude et al. 2004).

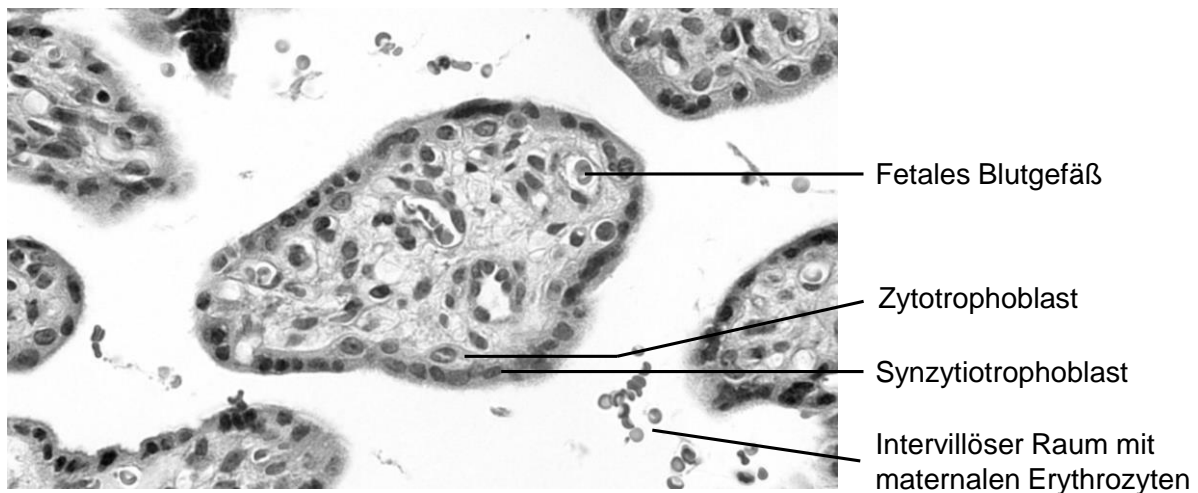


Abb. 1.2: Querschnitt durch eine Chorionzotte

Die abgebildete Zotte stammt aus einer Plazenta aus dem dritten Trimester. Bedeckt ist sie vom Synzytiotrophoblasten, der im direkten Kontakt zum maternalen Blut steht, das sich im intervillösen Raum befindet. Das Innere der Zotte enthält Bindegewebe, in das fetale Blutgefäße eingelagert sind. Unterhalb des Synzytiotrophoblasten befinden sich einzelne Zytotrophoblasten. H.E.-Färbung, primäre Vergrößerung 40 x.

1.2 Östrogene während der Schwangerschaft des Menschen

Östrogene gehören zu den weiblichen Sexualhormonen und sind aufgrund ihres Sterangrundgerüsts der Gruppe der Steroidhormone zuzuordnen. Während der Schwangerschaft steigt die Östrogenkonzentration im maternalen Blut stetig an und die Plazenta wird ab der 9. Schwangerschaftswoche zur Hauptquelle von Östrogenen (Albrecht und Pepe 1990). Das potenteste Östrogen ist Estradiol (E_2), daneben werden Estron (E_1) und Estriol (E_3) gebildet (Coelingh Bennink 2004). Nach Bindung an Östrogenrezeptoren (α oder β), die im Nukleus und Zytoplasma lokalisiert sind, induziert der Hormon-Rezeptor-Komplex als Transkriptionsfaktor die Expression bestimmter Gene im Zellkern (Bukovsky et al. 2003; Dahlman-Wright et al. 2006).

1.2.1 Das Zusammenspiel von sulfatierten Steroiden und der Sulfatase in der Sexualhormon-Synthese

Sulfatierte Steroidhormone werden durch Kopplung eines Sulfatrestes an Kohlenstoffatom C3 des Steroidgerüsts gebildet (Abb. 1.3), katalysiert von Enzymen aus der Gruppe der Sulfotransferasen (Rath et al. 2004). Diese Reaktion hat weitreichende Konsequenzen und räumt den sulfatierten Steroiden eine wichtige Rolle im Gebiet der Endokrinologie ein, die lange nicht verstanden wurde. Aufgrund des Sulfatrestes können sulfatierte Steroide nicht mehr an ihre entsprechenden Hormonrezeptoren binden und sind daher inaktive Hormone. Zudem bewirkt der Sulfatrest, der unter physiologischen Bedingungen negativ geladen ist, einen Verlust der Lipophilie des Moleküls, so dass ein Eintritt in Zellen über passive Diffusion durch die Zellmembran verhindert wird. Aufgrund dieser beiden Tatsachen galten sulfatierte Steroide in der Vergangenheit als reine Endprodukte des Hormonstoffwechsels, die durch die erworbene Wasserlöslichkeit leicht ausgeschieden werden können (Reed et al. 2005).

Mit Entdeckung des Enzyms Sulfatase (Arylsulfatase C), das die Sulfatgruppe an Position 3 der Steroidhormone abspalten und die inaktiven Hormone wieder in die aktive Form überführen kann, erschienen die Steroidsulfate in einem neuen Licht. Dieser als Sulfataseweg bezeichnete Vorgang ermöglicht nach Abspalten des Sulfatrestes neben der Aktivierung zudem die weitere enzymatische Umwandlung der Steroide in Androgene, Östrogene und Gestagene. Die Sulfatase ist ubiquitär verteilt und die Plazenta, deren hohe Sulfataseaktivität erstmals Anfang der 60er Jahre beschrieben wurde (Pulkkinen 1961; Warren und Timberlake 1962), zeigt die höchste Expression dieses Enzyms (Reed et al. 2005). Dort ist die Sulfatase im Synzytiotrophoblasten lokalisiert, wo sie die plazentare Östrogensynthese aus sulfatierten Vorstufen ermöglicht (Dibbelt et al. 1989; Salido et al. 1990). Erblisch bedingt kann es zu einem Mangel an Sulfatase kommen, von dem die Plazenta als fetales Organ betroffen ist. Dieser Sulfatasemangel verhindert die Nutzung

sulfatierter Steroide für die Hormonsynthese und resultiert in einer verminderten Bildung plazentarer Östrogene. Trotzdem verlaufen die Schwangerschaften normal (France et al. 1973; Osathanondh et al. 1976; Gips et al. 1980). Der Sulfatasemangel wurde lediglich bei männlichen Nachkommen beschrieben und ruft das Erkrankungsbild der X-chromosomal rezessiven Ichthyose hervor. Hierbei handelt es sich um eine Verhornungsstörung der Haut, bei der es zu einer Ansammlung von Cholesterolsulfat im Stratum corneum kommt (Hernández-Martín et al. 1999; Elias et al. 2004).

Sulfatierte Steroidhormone übersteigen im Plasma die Konzentration ihrer unkonjugierten Form um ein Vielfaches. DHEAS, das nach Cholesterol das Steroid mit der höchsten Plasmakonzentration beim Menschen darstellt, liegt in Konzentrationen um 10 µM vor, während diese bei der unsulfatierten Form Dehydroepiandrosteron (DHEA) nur 10 nM beträgt (Baulieu 1996). Aufgrund ihrer Bindung an Albumin haben sulfatierte Steroide eine verlängerte Halbwertszeit und werden inzwischen als Reservoir für die Bildung aktiver Androgene und Östrogene angesehen. Die Sulfatierung schützt zudem durch Inaktivierung der Hormone den Körper vor zu hohen Hormonkonzentrationen (Reed et al. 2005). Bevor sulfatierte Steroide von der intrazellulär liegenden Sulfatase wieder aktiviert werden können, müssen die hydrophilen Moleküle allerdings durch Transporter von den Zellen aufgenommen werden. Diese Transporter sind Gegenstand dieser Arbeit und werden in den Kapiteln 1.4–1.6 näher erläutert.

Neben den klassischen Bildungsstätten von Steroidhormonen, wie den Ovarien, den Hoden, den Nebennieren und der Plazenta, werden viele Androgene und Östrogene in peripheren Geweben produziert. 40 % der Androgene beim Mann, 75 % der Östrogene bei der Frau vor bzw. fast 100 % während der Postmenopause werden in Fettgewebe, Haut, Prostata bzw. Endometrium und Brust gebildet. Diese Gewebe sind mit den nötigen Enzymen ausgestattet, um aus sulfatierten Vorstufen aus der Nebenniere, wie DHEAS oder Estron-3-sulfat (E_1S), aktive Hormone direkt vor Ort zu bilden (Labrie 1991). Labrie ergänzte hierbei das Feld der klassischen Hormonwirkung, bestehend aus endokrin, parakrin und autokrin um das Gebiet der intrakrinen Wirkung. Neu ist hierbei, dass die aus inaktiven Vorstufen gebildeten Androgene und Östrogene ihre Wirkung direkt in der produzierenden Zelle entfalten, ohne vorher in den Extrazellularraum abgegeben zu werden, wie es selbst bei der autokrinen Wirkungsweise der Fall ist, wo die Hormone an der Oberfläche der produzierenden Zelle wirken. Die intrakrine Aktivität ermöglicht eine maximale Wirkung mit bereits geringen Hormonkonzentrationen (Labrie 1991). Viele hormonsensitive Tumoren, beispielsweise Brust- und Prostatatumoren, bilden auf diese Weise Androgene und Östrogene, so dass die intrakrine Aktivität ein möglicher Angriffspunkt in der Therapie darstellt (Labrie 1991; Suzuki et al. 2005). Die humane Plazenta nutzt als endokrines Organ für ihre Östrogensynthese

ebenfalls die sulfatierten Steroidhormone DHEAS und E₁S als Vorläufermoleküle, was im nächsten Kapitel näher beschrieben wird.

Bei Tieren ist eine Produktion von sulfatierten Steroiden beim Eber bekannt, wo DHEAS und E₁S im Hoden gebildet werden (Baulieu et al. 1967; Claus und Hoffmann 1980; Hoffmann et al. 2010) und die im Hoden-Nebenhoden-Kompartiment exprimierten Enzyme Sulfatase und Sulfotransferase über den Anteil konjugierter und unkonjugierter Steroide bestimmen (Mutembei et al. 2009; Hoffmann et al. 2010). Während der Trächtigkeit von Sau, Stute und Kuh stellt Estron das Hauptöstrogen dar, das vor allem in konjugierter Form als E₁S im maternalen Blut gemessen wird (Robertson und King 1974; Döcke 1994; Hoffmann et al. 1996, 1997). In der bovinen Plazenta werden sowohl die Sulfatase als auch die Sulfotransferase exprimiert, die im Zusammenspiel die Höhe des aktiven Estrons und des inaktiven E₁S regulieren (Hoffmann und Schuler 2002). Beim Hund hingegen gelang bisher noch kein zuverlässiger Nachweis von sulfatierten Steroiden.

1.2.2 Syntheseweg von Östrogenen in der humanen Plazenta

Im Gegensatz zu den Ovarien, die Östrogene *de novo* aus Cholesterol bilden (Linnemann und Kühl 2005), bezieht die Plazenta Vorstufen aus dem fetalen und maternalen Blut. Ein wichtiges Vorläufermolekül ist das C19-Steroid DHEA, das vor allem in seiner sulfatierten Form als DHEAS vorkommt und in der fetalen und maternalen Nebenniere gebildet wird (Siiteri und MacDonald 1963; Rainey et al. 2004; Rainey und Nakamura 2008). Die Bezeichnung C19-Steroid bezieht sich auf die Anzahl von Kohlenstoffatomen innerhalb des Molekülgerüsts. Sie gehören zur Gruppe der Androgene, während Östrogene mit einem Kohlenstoffatom weniger als C18-Steroide bezeichnet werden (Abb. 1.3).

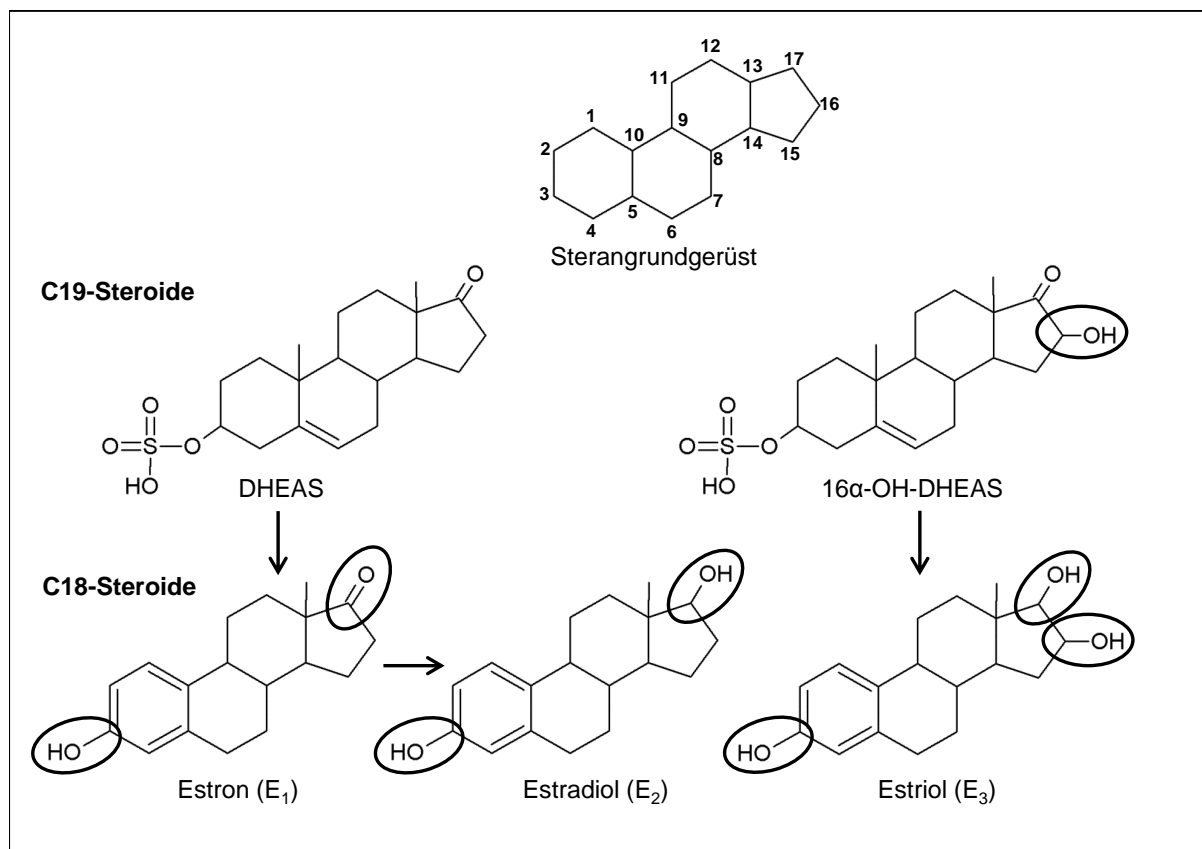


Abb. 1.3: Strukturformeln der sulfatierten Östrogenvorstufen und der Östrogene

Östrogene leiten sich vom Steran ab, das die Grundlage für die Nummerierung der Kohlenstoffatome bildet. Die sulfatierten Östrogenvorstufen DHEAS und 16α-OH-DHEAS gehören aufgrund ihrer Anzahl an Kohlenstoffatomen zu den C19-Steroiden und werden in Estron und Estradiol bzw. Estriol umgewandelt. Sie besitzen am Kohlenstoff 3 eine Sulfatgruppe, die unter physiologischen Bedingungen das Proton der OH-Gruppe abspaltet und negativ geladen ist. 16α-OH-DHEAS besitzt zudem eine Hydroxylgruppe am Kohlenstoff 16. Die Östrogene Estron (E₁), Estradiol (E₂) und Estriol (E₃) enthalten eine Methylgruppe weniger und damit nur 18 C-Atome. Die Endungen der Namen leiten sich von der chemischen Struktur der Moleküle ab. **Estron** ist nach seiner Ketogruppe am Kohlenstoff 17 benannt, die mit „-on“ bezeichnet wird. Die Endung „-ol“ wird für Hydroxylgruppen verwandt, von denen bei Estradiol zwei und bei Estriol drei vorliegen. Die alternative Benennung E₁, E₂ und E₃ bezieht sich ebenfalls auf die Anzahl der Hydroxylgruppen. Die Strukturformeln wurden mit dem Programm ACD/ChemSketch 12.01 erstellt.

Nachdem DHEAS die Plazenta erreicht hat und über Transporter in den Synzytiotrophoblasten aufgenommen wurde, steht es, wie in Abb. 1.4 dargestellt, der Östrogensynthese zur Verfügung. Hierzu wird zunächst der Sulfatrest durch das Enzym Steroidsulfatase abgespalten. DHEA wird von der 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase (3β-HSD) zu Androstendion umgewandelt. Die Aromatase (CYP19A1) bildet daraus Estron, welches über die 17β-Hydroxysteroiddehydrogenase (17β-HSD) in Estradiol umgewandelt wird. Alternativ kann die 17β-HSD zuerst eine Umwandlung von Androstendion in Testosteron durchführen, das dann durch die Aromatase zu Estradiol metabolisiert wird (Albrecht und Pepe 1990; Pasqualini 2005). Eine Untersuchung der Chorionkarzinomzelllinie

JEG-3 zeigte, dass jedoch möglicherweise der erste Weg bevorzugt wird, da die Aromatase eine höhere Affinität zu Androstendion als zu Testosteron hat (Samson et al. 2009).

In der fetalen Leber wird aus DHEAS über die 16 α -Hydroxylase CYP3A7 16 α -OH-DHEAS gebildet, das als Vorstufe für die plazentare Estriolsynthese dient (Ryan 1959a; Milewich et al. 1986; Kitada et al. 1987). 16 α -OH-DHEAS wird wie DHEAS in der Plazenta desulfatiert und von den genannten Enzymen in Estriol umgewandelt (Abb. 1.4) Hierbei wird in der Literatur zum einen der Syntheseweg über 16 α -OH-Estron aufgeführt (Sullivan 2004; Linnemann und Kühl 2005). Andere Autoren beschreiben den Weg über 16 α -OH-Testosteron und alternativ die direkte Aromatisierung von 16 α -OH-Androstendion zu Estriol ohne die Zwischenstufe 16 α -OH-Estron (Ryan 1959a; Albrecht und Pepe 1990; Kleinstein und Gips 2000). Die gebildeten Östrogene können aufgrund ihrer Lipophilie durch Diffusion in das fetale und maternale Blut abgegeben werden. Anders ist die Situation bei Eintritt der Vorläufermoleküle DHEAS und 16 α -OH-DHEAS in die Zelle. Aufgrund ihres Sulfatrestes sind sie hydrophil und auf die Aufnahme über Transportermoleküle in der Zellmembran angewiesen. Diese sind in Abb. 1.4 bereits eingezeichnet und werden in den Kapiteln 1.4–1.6 näher erläutert.

Mit zunehmender Reifung der fetalen Nebenniere steigen die fetale DHEAS-Produktion und die in der Mutter gemessene Östrogenkonzentration an. Es konnte gezeigt werden, dass DHEAS von fetaler und maternaler Seite gegen Ende der Schwangerschaft etwa gleichermaßen zur plazentaren Estron- und Estradiolsynthese beitragen, während Estriol hingegen zu über 90 % aus dem fetalen 16 α -OH-DHEAS gebildet wird (Siiteri und MacDonald 1966). Das Zusammenspiel von Fetus und Plazenta während der Östrogensynthese wird als fetoplazentare Einheit bezeichnet (Diczfalusy 1964). Sie ermöglicht, anhand der Östrogenkonzentrationen Rückschlüsse auf die Gesundheit des Fetus zu ziehen (Kapitel 1.2.6).

Neben DHEAS kann auch E₁S zur Estradiolsynthese herangezogen werden. Eine Inkubation von isolierten Zellen aus Amnion, Chorion und Dezidua mit E₁S zeigen eine Hydrolyse von E₁S zu Estron und dessen Umwandlung zu Estradiol (Mitchell et al. 1984).

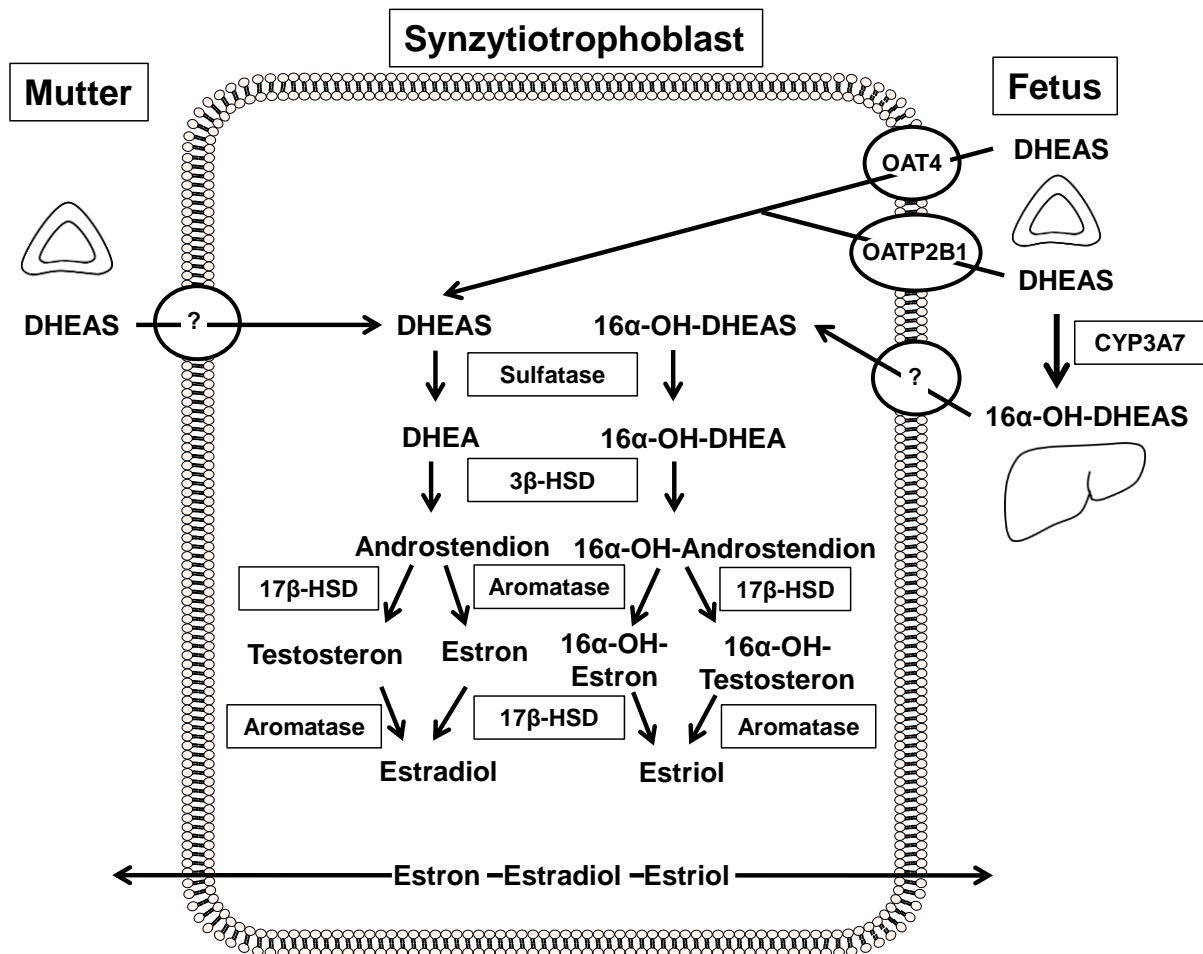


Abb. 1.4: Syntheseweg von Östrogenen in der humanen Plazenta

Das Androgen DHEAS wird in der fetalen und maternalen Nebenniere synthetisiert und gelangt über Transporter in den Synzytiotrophoblasten, wo es über die dargestellten Enzyme in Estron und Estradiol umgewandelt wird. 16α-OH-DHEAS wird in der fetalen Leber durch Hydroxylierung von DHEAS gebildet und ist ebenfalls auf die transportervermittelte Aufnahme angewiesen. Innerhalb der Zelle wird es in Estriol umgewandelt. Auf der basalen (fetalen) Seite sind bereits die Transporter OAT4 und OATP2B1 identifiziert, die die Aufnahme von DHEAS in die Zellen vermitteln. Transporter für 16α-OH-DHEAS sowie Transporter an der apikalen, dem maternalen Blut zugewandten Seite, waren bisher nicht identifiziert (in der Abbildung dargestellt mit „?“). In dieser Arbeit wurden als maternaler Transporter für DHEAS der Transporter SOAT und als fetale Carrier für die Aufnahme von 16α-OH-DHEAS die Transporter OAT4 und SOAT identifiziert. Die gebildeten Östrogene Estron, Estradiol und Estriol diffundieren aus der Zelle ins fetale und maternale Blut.

1.2.3 Konzentration von Steroidsulfaten während der Schwangerschaft

DHEAS wird in hohen Mengen von der fetalen und maternalen Nebenniere gebildet und ist das Steroidhormon, das in der höchsten Konzentration beim Menschen vorkommt (Samaras et al. 2013). Nach der Geburt fällt die Konzentration stark ab und wird erst nach dem 6.-8. Lebensjahr wieder vermehrt gebildet. In den Zwanzigern erreicht es die höchste Konzentration von etwa 10 µM (Baulieu 1996; Labrie et al. 2001; Siiteri 2005) und sinkt dann langsam aber kontinuierlich ab auf teilweise 10-20 % der Konzentration von jungen Menschen (Samaras et al. 2013). Ein Zusammenhang zwischen sinkenden DHEAS-

Konzentrationen und mentalem und physischem Abbau im Alter ist eine häufig gestellte Hypothese. Dies hat zu einem unkontrollierten Gebrauch von DHEA-Präparaten in den USA geführt, wo diese in Supermärkten erhältlich sind und in der Hoffnung auf einen „Jungbrunnen“-Effekt eingenommen werden. Effekte auf die Verbesserung kognitiver Fähigkeiten im Alter konnten bisher nicht nachgewiesen werden (Grimley Evans et al. 2006). Während der Schwangerschaft ist die Produktionsrate von DHEA und DHEAS in der Mutter doppelt so hoch wie vor der Schwangerschaft. Trotzdem ist die DHEAS-Plasmakonzentration selbst niedriger als bei Nichtschwangeren und nimmt im Verlauf der Schwangerschaft sogar weiter ab. Dies hängt mit dem massiven Verbrauch von DHEAS für die Östrogensynthese in der Plazenta zusammen (Tagawa et al. 2004). Konzentrationen von DHEAS, 16 α -OH-DHEAS und E₁S im Nabelblut sowie im maternalen Blut sind in Tab. 1.1 aufgeführt.

Tab. 1.1: Konzentrationen der sulfatierten Steroide DHEAS, 16 α -OH-DHEAS und E₁S im Nabelblut und im maternalen Blut des Menschen

	Nabelarterie	Nabelvene	Mutter	Quelle
DHEAS	4,5-6,3 μ M	3,8-4,5 μ M	2,2-3,5 μ M (vor Einsetzen der Geburt)	Laatikainen et al. 1980 Mathur et al. 1980
16α-OH-DHEAS	10,5 μ M	8,4 μ M	ca. 0,5 μ M (vor Einsetzen der Geburt)	Laatikainen et al. 1980
E₁S	91 nM	171 nM	bis 494 nM (Höchststand in der 35. SSW)	Honjo et al. 1986

Die aufgelisteten Konzentrationen der sulfatierten Steroide zeigen, dass DHEAS sowohl vom Fetus als auch der Mutter gebildet wird, da es bei beiden in hohen Konzentrationen vorkommt. 16 α -OH-DHEAS hingegen wird hauptsächlich vom Fetus gebildet. In den aufgelisteten Studien waren die DHEAS- und 16 α -OH-DHEAS-Konzentration in der Nabelarterie jeweils höher als in der Nabelvene, was darauf hindeutet, dass die beiden Substrate in der Plazenta verbraucht werden. Für E₁S ermittelten Honjo et al. (1986) eine negative arterio-venöse Differenz, also eine höhere Konzentration in der Nabelvene als in der Nabelarterie. In Verbindung mit den hohen Konzentrationen von E₁S im maternalen Blut spricht dies für einen maternalen Ursprung dieses Substrates.

Zu ergänzen ist noch eine Studie von Kojima et al. (1981), in der konjugiertes und freies DHEA und 16 α -OH-DHEA im Nabelblut gemessen wurden. Die Konzentrationen lagen in der gleichen Größenordnung, die in der Tabelle aufgeführt sind. Da allerdings nicht der Anteil an sulfatiertem Substrat gemessen wurde, sind die Werte nicht in die Tabelle aufgenommen worden. Deutlich niedrigere Konzentrationen wurden hingegen in einer Studie von Hill et al.

(2014) im Nabelblut ermittelt. Die Konzentrationen lagen in dieser Studie deutlich unterhalb der in den anderen Untersuchungen aufgezeigten Werte, mit konjugiertem DHEA von 1,5 μM und konjugiertem 16 α -OH-DHEA zwischen 1,1 (Nabelarterie) und 2,4 μM (Nabelvene). Allerdings wurden in den zitierten Arbeiten nicht die gleichen Bestimmungsmethoden eingesetzt, was die unterschiedlichen gemessenen Konzentrationen erklären könnte. Bei Hill et al. (2014) wurde die Gaschromatographie-Massenspektrometrie zur Messung der Steroidhormone verwendet, bei Laatikainen et al. (1980) die Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor und Mathur et al. (1980) sowie Kojima et al. (1981) führten die Konzentrationsbestimmungen mittels Radioimmunassays durch.

1.2.4 Konzentration von Östrogenen während der Schwangerschaft

Die Östrogenkonzentrationen steigen während der Schwangerschaft stetig an und fallen nach der Geburt schnell ab. Ein Überblick über die maternalen Hormonkonzentrationen wurde von Kuijper et al. (2013) zusammengestellt, indem verschiedene Studien aufgeführt und verglichen wurden. Die Spannweite der aufgeführten Studien ist für die letzten Schwangerschaftswochen (SSW) in Tab. 1.2 aufgelistet. Gegen Ende der Schwangerschaft steigt die Estradiolkonzentration auf das ca. 100-fache im Vergleich zu Nichtschwangeren an. Das Östrogen Estriol kommt normalerweise nur in vernachlässigbaren Konzentrationen vor, stellt aber während der Schwangerschaft das Hauptöstrogen dar. Die Konzentrationen dieses Hormons unterscheiden sich deutlich zwischen den verschiedenen Studien, auffallend ist allerdings in allen Studien der extrem starke Anstieg während des Verlaufs der Schwangerschaft. Aufgrund seines vornehmlichen Vorkommens während der Schwangerschaft gilt Estriol auch als „Schwangerschaftsöstrogen“, die Funktion ist allerdings bisher unklar. Ihm ist daher ein eigenes Kapitel (1.2.6) gewidmet. Ein weiteres Östrogen, das Estetrol (E_4) besitzt zusätzlich am Kohlenstoff 15 eine vierte Hydroxylgruppe und wird ausschließlich in der humanen fetalen Leber gebildet und über die Plazenta ins maternale Blut abgegeben (Holinka et al. 2008).

Tab. 1.2: Konzentrationen von Estron, Estradiol, Estriol und Estetrol gegen Ende der Schwangerschaft des Menschen

	Mutter	Quelle
Estron	19-104 nM (37.-38. SSW)	Kuijper et al. 2013
Estradiol	28-115 nM (37.-42. SSW)	Kuijper et al. 2013
Estriol	28-1051 nM (37.-42. SSW)	Kuijper et al. 2013
Estetrol	ca. 3 nM (37.-41. SSW)	Holinka et al. 2008

1.2.5 Die Rolle von Östrogenen während der Schwangerschaft

Während dem ebenfalls von der Plazenta gebildeten Progesteron eindeutig die Funktion eines schwangerschaftserhaltenden Hormons zukommt, ist die Bedeutung von Östrogenen während der Schwangerschaft nicht so eindeutig. Es gibt verschiedene Erkrankungen, die mit verminderter plazentarer Östrogensynthese einhergehen und trotzdem normale Schwangerschaften ermöglichen. So sind bei placentarem Sulfatase- oder Aromatasemangel aufgrund der Unterbrechung des Syntheseweges die von der Plazenta gebildeten Östrogene vermindert, es werden aber immerhin Konzentrationen von 1-10 nM erreicht (France et al. 1973; Osathanondh et al. 1976; Gips et al. 1980; Harada et al. 1992; Pepe und Albrecht 1995). Pepe und Albrecht (1995) vermuten, dass der Erhalt von normalen Schwangerschaften unter diesen Umständen nicht den Schluss zulässt, dass Östrogene für den Verlauf der Schwangerschaft unwichtig seien, jedoch anscheinend in hohem Überschuss gebildet würden. Für die Wirkung seien dagegen vor allem die Anwesenheit von Östrogenrezeptoren und eine ausreichend hohe lokale Östrogenkonzentration wichtig, um mit dem Rezeptor interagieren zu können. Folgende Funktionen übernehmen Östrogene während der Schwangerschaft:

1. Erhöhung der Progesteronsynthese: Progesteron wird aus Cholesterol gebildet, das im Blut aufgrund seiner Lipophilie an Plasmaproteinen gebunden transportiert wird, beispielsweise in Form von Low Density Lipoproteinen LDL (Gassmann und Lutz 2005). Östrogene haben stimulierende Effekte auf die LDL-Rezeptor-Expression im Synzytiotrophoblasten und erhöhen somit die rezeptorvermittelte LDL-Aufnahme, wodurch den Zellen mehr Cholesterol für die Progesteronsynthese zur Verfügung steht. Des Weiteren kommt es zu einer östrogenvermittelten erhöhten Expression des Cholesterol-*side-chain-cleavage*-Enzyms (P450scc, CYP11A1), das durch Abspaltung der Seitenkette Cholesterol in Pregnenolon überführt. Dieses kann anschließend von der 3 β -HSD in Progesteron umgewandelt werden (Pepe und Albrecht 1995).
2. Erhöhung der uteroplazentaren Blutversorgung: Östrogene stimulieren das Renin-Angiotensin-System und sorgen somit für ein erhöhtes Plasmavolumen. Zudem führen Östrogene zu einer lokalen Vasodilatation in der uteroplazentaren Einheit und erhöhen die placentare Angiogenese (Resnik et al. 1974; Pepe und Albrecht 1995; Albrecht und Pepe 2010).
3. Reifung der fetalen Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse: Zu Beginn der Schwangerschaft dominiert in der Plazenta die Umwandlung von inaktivem Cortison zu aktivem Cortisol, das im Fetus ein negatives Feedback auf die Hypophyse ausübt und eine ACTH-Sekretion unterdrückt. In der Folge entwickelt die fetale Nebenniere nicht die

Fähigkeit, Cortisol selbst zu synthetisieren. Die Umwandlung von Cortison zu Cortisol wird von der 11 β -HSD Typ 1 katalysiert. Eine andere Isoform, die 11 β -HSD Typ 2 hingegen katalysiert alleinig die entgegengesetzte Umwandlung von aktivem Cortisol zu inaktivem Cortison. Beide Enzymisoformen werden durch steigende Östrogenkonzentrationen hochreguliert und die 11 β -HSD Typ 2 bewirkt im Verlauf der Schwangerschaft eine vermehrte Bildung des inaktiven Cortisons. Die Hemmung der fetalen ACTH-Sekretion wird daher aufgehoben und die Reifung der fetalen Nebenniere mit Beginn der eigenen Cortisolsynthese schreitet voran. Cortisol führt zur Surfactantbildung und Reifung der fetalen Lunge (Pepe und Albrecht 1995, 1999).

4. Vorbereitung der Brust auf die Laktation: In Zusammenspiel mit anderen Hormonen wie Progesteron und Prolaktin stimulieren Östrogene die Proliferation von Drüsenepithelzellen in der Brust und bewirken eine vermehrte Aufzweigung der Drüsengänge sowie die Bildung neuer Alveolen (Pepe und Albrecht 1995).

5. Einleitung der Geburt:

a) Regulation der Uteruskontraktilität: Das Myometrium unterliegt stark wechselnden Anforderungen. Steht während der Schwangerschaft die Ruhigstellung des Myometriums im Vordergrund, so ist während der Geburt eine starke Kontraktilität gefragt. Die Regulation dieser gegensätzlichen Zustände setzt ein Zusammenspiel vieler Hormone voraus. Progesteron bewirkt die Ruhigstellung des Myometriums, wobei es bei vielen Tierarten vor der Geburt zu einem Progesteronabfall kommt. Dieser Progesteronabfall kann jedoch nicht beim Menschen beobachtet werden; es wird hingegen eine Regulierung auf Ebene der uterinen Rezeptoren vermutet, die eine verminderte Progesteronwirkung hervorruft (Kota et al. 2013). Mit zunehmender Reifung der fetalen Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse kommt es zur vermehrten Produktion von C19-Steroiden und damit zu einem Anstieg plazentarer Östrogene. Diese fördern die Uteruskontraktilität durch Hochregulierung kontraktionsassoziierter Proteine. Beispielsweise werden vermehrt Gap Junctions ins Myometrium eingebaut, Calciumkanäle gebildet und für die Kontraktion benötigte Enzyme wie die Myosin-Leichtketten-Kinase hochreguliert. Östrogene steigern zudem die Prostaglandin E₂- und F_{2 α} -Produktion sowie die Anzahl an Prostaglandin- und Oxytozinrezeptoren. Sowohl Prostaglandine als auch Oxytozin sind an der Auslösung von Kontraktionen beteiligt (Gibb und Challis 2006; Kota et al. 2013).

Bei Schwangerschaften mit Sulfatasemangel, die mit einer verminderten Östrogensynthese einhergehen, kann es zu verlängerten Schwangerschaften aufgrund einer verzögerten Geburtseinleitung kommen (France et al. 1973; Osathanondh et al. 1976). Wie oben erwähnt verlaufen die Schwangerschaft und die Entwicklung des Fetus ansonsten normal.

b) Reifung der Cervix: Der Anstieg von Östrogenen gegen Ende der Schwangerschaft ist zusammen mit anderen Faktoren an der Erweichung und Dilatation der Cervix beteiligt (Kota et al. 2013). Schwangerschaften mit verminderten Östrogenkonzentrationen können mit mangelnder Öffnung der Cervix zum Geburtszeitpunkt einhergehen und einen Kaiserschnitt indizieren. Dies wurde ebenfalls am Beispiel des Sulfatasemangels beschrieben (France et al. 1973; Osathanondh et al. 1976).

1.2.6 Das „Schwangerschaftshormon“ Estriol

Während der Schwangerschaft werden hohe Mengen an Estriol gebildet, das ca. 60-70 % der maternalen Östrogene darstellt, während Estriol außerhalb der Schwangerschaft kaum vorhanden ist (Pasqualini 2005). Die massive Estriolbildung ist eine Besonderheit von Hominiden und kommt neben dem Menschen außerdem beim Gorilla, Orang-Utan und Schimpansen vor (Albrecht und Pepe 1990). Estriol wird wie bereits beschrieben im Synzytiotrophoblasten aus dem fetalen Vorläufermolekül 16α -OH-DHEAS gebildet, indem dieses von der Sulfatase desulfatiert und über die oben genannten Enzyme in Estriol umgewandelt wird (Abb. 1.4). Eine Estriolbildung ist auch aus Estron und Estradiol möglich, stellt aber nicht den Hauptsyntheseweg während der Schwangerschaft dar (Siiteri und MacDonald 1963). Die besondere Rolle des fetalen 16α -OH-DHEAS als Substrat der Estriolsynthese wird bei verschiedenen pathologischen Zuständen deutlich: Kommt es während der Befruchtung zu einer fehlerhaften Anzahl an Chromosomen in der Eizelle, entsteht eine hydatiforme Mole, die durch Proliferation der Zyto- und Synzytiotrophoblasten sowie durch ödematöse Degeneration des Zottenstromas gekennzeichnet ist. Bei der kompletten hydatiformen Mole geht der mütterliche Chromosomensatz verloren und der paternale wird verdoppelt, so dass ein diploider männlicher Chromosomensatz vorliegt. Es entwickelt sich lediglich Trophoblastengewebe und kein embryonales Gewebe. Bei der partiellen hydatiformen Mole entsteht eine Triploidie durch Fertilisation einer Eizelle mit zwei Spermien (Pfisterer 2000). Bei einer anderen Erkrankung, der Anenzephalie, handelt es sich um einen Neuralrohrdefekt, bei dem Vorderhirn, Meningen, Schädeldach und Teile der Kopfhaut fehlen (Miny und Holzgreve 2000). Durch die fehlende hypophysäre ACTH-Stimulation kommt es zu einer Hypoplasie der fetalen Nebenniere mit verminderter oder mangelnder DHEAS-Synthese. Sowohl bei der hydatiformen Mole als auch der Anenzephalie fehlen also die fetalen Östrogen-Vorläufermoleküle, was sich vor allem in einer sehr niedrigen maternalen Estriolkonzentration bemerkbar macht, da normalerweise 90 % des Estriols aus dem fetalen 16α -OH-DHEAS gebildet werden. Die Synthese von Estradiol hingegen ist nicht alleinig auf fetale Vorstufen angewiesen, so dass dessen Konzentration bei den genannten Krankheiten nur mittelmäßig oder gar nicht vermindert ist (MacDonald und Siiteri 1964, 1965; Siiteri und MacDonald 1966; Tulchinsky et al. 1977). Die plazentare

Estriolsynthese ist auch bei Schwangerschaften mit vom Down-Syndrom betroffenen Feten vermindert, was vermutlich auf eine verminderte DHEAS-Bildung in der Nebenniere bzw. eine verminderte 16 α -Hydroxylierung in der fetalen Leber zurückzuführen ist (Newby et al. 2000). Aufgrund des Zusammenhangs zwischen fetaler Gesundheit und gebildetem Estriol ist Estriol neben α_1 -Fetoprotein und β -hCG Teil des Triple-Tests. Bei diesem werden auf Basis der drei genannten Hormonkonzentrationen im maternalen Blut Rückschlüsse auf Besonderheiten des ungeborenen Kindes gezogen, insbesondere auf die Wahrscheinlichkeit von Chromosomenanomalien wie Trisomie 21 und Neuralrohrdefekten. Aufgrund einer relativ hohen Falsch-Positiv-Rate wird er allerdings inzwischen zurückhaltender eingesetzt und sollte vor allem als Anhaltspunkt für eine weiterführende Diagnostik gesehen werden (Breckwoldt 2008). Estriol kann zudem zur Überwachung der fetoplazentaren Einheit bei Verdacht auf Plazentainsuffizienz bestimmt werden (Breckwoldt und Karck 2008). Da die Estriolbildung von der Funktion der fetalen Nebenniere abhängt, nimmt mit zunehmender Reife der Nebenniere die Estriolkonzentration im maternalen Blut, Urin und Speichel zu. Hohe Estriolwerte können daher als Zeichen der nahenden Geburt gewertet werden, so dass Estriol auch als Marker für zu erwartende Frühgeburten herangezogen werden kann (McGregor et al. 1995; Goodwin 1999; Goldenberg et al. 2005). Abgesehen von diversen Tests zum Bewerten des fetalen Wohlbefindens ist die physiologische Rolle von Estriol während der Schwangerschaft ungeklärt. Während Estradiol als potentestes Östrogen gilt und hauptsächlich für die oben beschriebenen östrogenvermittelten Wirkungen verantwortlich ist, gilt Estriol als schwächstes Östrogen mit lediglich kurzer Wirkdauer (Katzenellenbogen 1984; Coelingh Bennink 2004). Eine Studie an Schafen zeigte allerdings, dass Estriol etwa gleichermaßen den uterinen Blutfluss steigert wie Estradiol (Resnik et al. 1974).

1.3 Östrogene während der Trächtigkeit von Tieren

Die Trächtigkeit bei Tieren ist durch starke speziesabhängige Unterschiede gekennzeichnet. Neben unterschiedlichen Plazentatypen betrifft dies auch das Ausmaß und den Verlauf der Östrogensynthese sowie das Ausbilden einer fetoplazentaren Einheit.

1.3.1 Pferd

Ähnlich wie beim Menschen ist die plazentare Östrogensynthese beim Pferd von C19-Steroiden abhängig, da der equinen Plazenta das Enzym 17 α -Hydroxylase/17,20-Lyase (CYP17) fehlt, welches für eine *de novo*-Synthese von Östrogenen aus Cholesterol benötigt wird (Arai et al. 2006). Während beim Menschen die fetalen Nebennieren Quellen von C19-Steroiden darstellen, stammen diese beim Pferd aus den fetalen Gonaden (Pashen und

Allen 1979; Fowden et al. 2008). Es kann also auch beim Pferd von einer fetoplazentaren Einheit gesprochen werden. Eine Besonderheit der equinen Plazenta ist die Bildung der Östrogene Equilin und Equilenin, die neben Estron und Estradiol gebildet werden (Fowden et al. 2008). Die höchsten Östrogenkonzentrationen werden in der Graviditätsmitte gemessen, wobei E₁S das Hauptöstrogen darstellt (Hoffmann et al. 1996).

1.3.2 Rind und Schwein

Die bovine und porcine Plazenta exprimiert CYP17 sowie alle weiteren nötigen Enzyme, um Östrogene *de novo* zu synthetisieren (Conley et al. 1992, 1994; Döcke 1994; Schuler et al. 2006), so dass die Östrogensynthese im Gegensatz zu Mensch und Pferd unabhängig von fetalen Vorstufen ablaufen kann. Das Konzept der fetoplazentaren Einheit ist daher auf diese beiden Spezies eher nicht anwendbar. Beim Rind werden die höchsten Östrogenkonzentrationen gegen Ende der Trächtigkeit gemessen, wobei wie beim Pferd E₁S das Hauptöstrogen darstellt (Hoffmann et al. 1997).

1.3.3 Hund

In den meisten Untersuchungen wurden keine Unterschiede in den Östrogenplasmaspiegeln von graviden Hündinnen und sich in der Lutealphase befindlichen nicht-graviden Hündinnen festgestellt (Nett et al. 1975; Edqvist et al. 1975; Gräf 1978; Döcke 1994; Hoffmann et al. 1994). Zudem wurden keine steroidogenen Enzyme in der caninen Plazenta nachgewiesen, so dass weder eine Östrogen- noch eine Progesteronsynthese in der Plazenta darstellbar ist (Nishiyama et al. 1999; Verstegen-Onclin und Verstegen 2008). Die fehlende plazentare Östrogensynthese beim Hund könnte evolutionsbiologisch mit der beim Hund bekannten Östrogen-induzierten Myelotoxizität zusammenhängen (Sontas et al. 2009).

1.4 Die Familie der SLC10-Transporter

Wie in den vorangehenden Kapiteln beschrieben, findet die plazentare Synthese freier Östrogene aus den sulfatierten Vorläufermolekülen DHEAS, 16 α -OH-DHEAS und E₁S im Synzytiotrophoblasten statt. Für den Eintritt in die Zelle sind sulfatierte Steroide auf die Aufnahme durch Transporter angewiesen, die in der Zellmembran lokalisiert sind. Bereits bekannte Transporter für sulfatierte Steroide in der Plazenta sowie deren Transporterfamilien werden in den nun folgenden Kapiteln erläutert.

1.4.1 Überblick über die SLC10-Familie

Die *Solute Carrier*-Familie 10 (SLC10) beinhaltet ursprünglich nur die beiden Gallensäuretransporter *Na⁺/Taurocholate Cotransporting Polypeptide* (NTCP, SLC10A1) und den *Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporter* (ASBT, SLC10A2), die am Aufrechterhalten des enterohepatischen Kreislaufs beteiligt sind (Claro da Silva et al. 2013). Im Jahr 2004 wurde an diesem Institut die Klonierung eines weiteren Carriers, des *Sodium-dependent Organic Anion Transporters* (SOAT, SLC10A6), veröffentlicht. Besonders war hierbei, dass dieser Carrier nicht die klassischen Gallensäuren transportiert, wie es bei NTCP und ASBT der Fall ist, sondern eine Aufnahme von sulfatierten Steroidhormonen vornimmt und unter anderem in Organen des Reproduktionsgeschehens exprimiert wird (Geyer et al. 2004, 2007). Weitere Mitglieder dieser Familie sind der SLC10A3, A4, A5 und A7, deren physiologische Funktionen derzeit allerdings noch zum Teil unklar sind (Döring et al. 2012). Für SLC10A3 wurde eine ubiquitäre Expression beschrieben (Alcalay und Toniolo 1988), während SLC10A4 am höchsten im Gehirn exprimiert wird (Splinter et al. 2006; Geyer et al. 2008). Der SLC10A5 wird überwiegend in Leber und Niere (Fernandes et al. 2007) und der SLC10A7 in Hoden und Leber (Godoy et al. 2007) exprimiert.

1.4.2 Die Gallensäuretransporter NTCP (SLC10A1) und ASBT (SLC10A2)

Das *Na⁺/Taurocholate Cotransporting Polypeptide* NTCP und der *Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporter* ASBT sind hauptsächlich in der Leber (NTCP) bzw. im Ileum (ASBT) lokalisiert und beteiligen sich am enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren (Claro da Silva et al. 2013).

Substratspektrum

Beide Carrier transportieren unkonjugierte sowie taurin- und glycinkonjugierte Gallensäuren. NTCP hat ein etwas breiteres Substratspektrum als ASBT und transportiert zusätzlich sulfatierte Gallensäuren, sulfatierte Steroidhormone sowie freie und konjugierte Schilddrüsenhormone (Döring et al. 2012; Grosser 2013). Weitere Substrate des NTCP stellen Bromosulfophthalein (BSP) und einige Vertreter der Arzneigruppe der Statine dar, die durch Hemmung des Enzyms 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase die Bildung von Cholesterin blockieren und daher als Cholesterinsenker eingesetzt werden (Fujino et al. 2005; Ho et al. 2006; Greupink et al. 2011). Die Aufnahme von Substraten erfolgt bei beiden Transportern natriumabhängig in einem Verhältnis von zwei Natriumionen zu einem Gallensäuremolekül. Die treibende Kraft dieses Symports ist der durch die Natrium-Kalium-ATPase aufrecht gehaltene einwärts gerichtete Natriumgradient (Weinman 1997; Weinman et al. 1998).

Organverteilung und physiologische Bedeutung

Gallensäuren werden nach der Nahrungsaufnahme von der Gallenblase ins Duodenum abgegeben und emulgieren unter Bildung von Gallensäure-Fett-Mizellen die mit der Nahrung aufgenommenen Fette, um eine Verdauung und Resorption zu ermöglichen. ASBT ist in der apikalen Bürstensaummembran der Enterozyten des distalen Ileums und beim Menschen zusätzlich im Duodenum lokalisiert (Shneider et al. 1995; Wong et al. 1995; Hruz et al. 2006). Dort nimmt er den Großteil der in den Darm abgegeben Gallensäuren auf, die nachfolgend dem Portalblut in einem enterohepatischen Kreislauf zugeführt werden (Dawson et al. 2003).

NTCP befindet sich in der sinusoidalen Membran der Hepatozyten und gewinnt die aus dem Darm aufgenommenen Gallensäuren natriumabhängig aus dem Portalblut zurück (Ananthanarayanan et al. 1994; Stieger et al. 1994; Kullak-Ublick et al. 1997). Zudem erfolgt eine Aufnahme in die Hepatozyten über die Transporter OATP1B1 und OATP1B3, die unabhängig von Natrium sind. Ein Zyklus des enterohepatischen Kreislaufs endet mit der Abgabe der Gallensäuren aus den Leberzellen in die Gallenblase, beispielsweise über die kanalikulär gelegene *Bile Salt Export Pump* BSEP (Claro da Silva et al. 2013).

Die zweithöchste Expression des ASBT liegt in proximalen Tubuluszellen der Niere vor, wo die Rückresorption filtrierter Gallensäuren deren Verlust über den Urin verhindert (Christie et al. 1996; Craddock et al. 1998). In der Plazenta wurde ASBT nicht nachgewiesen (Craddock et al. 1998).

Für NTCP wurde ein verkürztes Transkript in der Plazenta entdeckt, das möglicherweise nicht funktional ist (Craddock et al. 1998). In anderen Studien wurde kaum eine oder keine Expression von NTCP detektiert (Patel et al. 2003; Ugele et al. 2003). Messungen an isolierten mononukleären Trophoblasten zeigen zudem keinen Transport des NTCP-Substrates Taurocholat (Ugele et al. 2003). Zwar konnte in Vesikeln aus der basalen Membran der Synzytiotrophoblasten ein Taurocholattransport gemessen werden, dieser war allerdings natriumunabhängig und daher nicht durch den natriumabhängigen NTCP vermittelt (Marin et al. 1990). Beide Transporter wurden dennoch aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit zu SOAT in dieser Arbeit in Transportstudien mituntersucht.

Pharmakologische Bedeutung

Kürzlich wurde NTCP als Rezeptor für humane Hepatitis-B- und Hepatitis-D-Viren identifiziert. Ein Ausschalten des Transporters konnte eine Infektion von Tupaia-Hepatozyten (Spitzhörnchen) und von humanen Hepatozyten verhindern. Eine exogene NTCP-Expression von normalerweise nicht empfänglichen humanen Hepatokarzinomzellen hatte hingegen eine Infektion zur Folge (Yan et al. 2012). Zusätzlich konnte eine Infektion von Zellen mit Hepatitis-B-Viren durch physiologische NTCP-Substrate gehemmt werden (König et al.

2014). Somit könnte die Rolle von NTCP in der Pathogenese der Hepatitis-B- und Hepatitis-D-Virusinfektion neue Präventions- und Therapieoptionen ermöglichen.

1.4.3 Der Steroidsulfattransporter SOAT (SLC10A6)

Der *Sodium-dependent Organic Anion Transporter* SOAT transportiert vor allem sulfatierte Steroidhormone, die als inaktive Hormone zirkulieren und durch Aufnahme in die Zellen in Androgene und Östrogene umgewandelt werden können.

Substratspektrum

Im Gegensatz zu NTCP und ASBT ist SOAT kein klassischer Gallensäuretransporter, sondern transportiert die sulfatierten Steroidhormone DHEAS, E₁S, Estradiol-3-sulfat (E₂S), Pregnenolon-3-sulfat (PREGS) und Androstendiol-3-sulfat. Weitere Substrate sind die sulfatierte Gallensäure Tauroolithocholat-3-sulfat und die sulfatierten Sulfooxymethylpyrene (SMP) 2-SMP und 4-SMP. Als bisher einziges unsulfatiertes Substrat wurde die Gallensäure Tauroolithocholat detektiert, welche ein Substrat aller drei Carrier, NTCP, ASBT und SOAT, darstellt (Geyer et al. 2007; Grosser 2013; Fietz et al. 2013). Die Aufnahmen erfolgen wie auch bei NTCP und ASBT natriumabhängig, wobei ein Symport von Substrat und Natrium stattfindet (Geyer et al. 2004, 2007).

Organverteilung und physiologische Bedeutung

Die höchste Expression von humanem SOAT findet im Hoden statt und liegt um ein Vielfaches oberhalb der Expression in anderen Geweben (Geyer et al. 2007; Fietz et al. 2013). Eine Expression konnte zudem in Haut, Niere, Vagina, Pankreas und Brustdrüse detektiert werden. Geyer et al. (2007) zeigen zudem eine Expression von SOAT in der humanen Plazenta, während der Transporter in dem bei Fietz et al. (2013) eingesetzten cDNA-Panel nur sehr gering in der Plazenta exprimiert war. Nähere Untersuchungen von SOAT wurden bisher im Hoden und in der Brustdrüse durchgeführt:

Fietz et al. (2013) beschreiben die Lokalisation und mögliche physiologische Bedeutung von SOAT im humanen Hoden. Dieser wurde in den Hodenkanälchen (Tubuli seminiferi) in verschiedenen Keimzellstadien nachgewiesen, nämlich in den primären (zygotänen und pachytänen) und sekundären Spermatozyten, sowie in runden Spermatiden aus den Spermatogenesestadien I und II. Eine Produktion von Steroidsulfaten wie DHEAS und PREGS im humanen Hoden konnte bereits gezeigt werden (Laatikainen et al. 1971). Der SOAT-vermittelte Transport von sulfatierten Steroiden in die genannten Keimzellstadien und die damit ermöglichte Testosteron- und Östrogensynthese könnte eine wichtige Rolle in der Spermatogenese spielen. Fietz et al. (2013) zeigen, dass die SOAT-Expression bei Spermatogenesestörungen niedrig oder abwesend ist. Ob hierbei ein kausaler

Zusammenhang zwischen niedriger SOAT-Expression und eingeschränkter Spermatogenese vorliegt, soll anhand einer Slc10a6-Knockout-Maus untersucht werden.

Die Brustdrüse steht vor allem im Zusammenhang mit der Therapie von Mammatumoren im Interesse der Forschung, bei denen es sich mit jährlich 75 200 Neuerkrankungen um die häufigste bösartige Tumorart bei Frauen handelt (Deutsche Krebshilfe e.V. 2014). Die meisten Brusttumoren (ca. 95 %) sind in ihrer frühen Phase östrogenabhängig, zeigen also eine östrogenvermittelte erhöhte Proliferation, welche einen Angriffspunkt in der Therapie darstellt. Obwohl 2/3 der Tumoren während der Postmenopause auftreten, wo die Östrogenkonzentration aufgrund der nachlassenden Ovarfunktion niedrig ist, werden im betroffenen Brustgewebe Östrogenkonzentrationen gemessen, die signifikant gegenüber den Konzentrationen im Plasma oder im normalen Brustgewebe erhöht sind (Pasqualini 2004). Dies spricht für eine intratumorale Östrogensynthese, bei der die Zellen inaktive Vorstufen wie E₁S oder DHEAS in Estradiol umwandeln, welches dann in der produzierenden Zelle selbst an Östrogenrezeptoren bindet und seine Wirkung entfaltet (Suzuki et al. 2005). Eine Wirkung von Hormonen in der produzierenden Zelle wird auch als intrakrine Wirkungsweise bezeichnet (Labrie 1991). Die für die Synthese nötigen Enzyme Sulfatase, 3 β -HSD, Aromatase und 17 β -HSD wurden in Brusttumoren nachgewiesen (Suzuki et al. 2005). Mit einer Verhinderung der östrogenvermittelten Proliferation ist die antihormonelle Therapie eine wichtige Säule in der Brustkrebstherapie. Sie wird vor allem nach einer Operation als ergänzende Therapie eingesetzt, um einem Rückfall vorzubeugen und zielt auf eine Blockierung der Östrogenrezeptoren oder eine Unterbrechung der Östrogensynthese unter Einsatz von Enzymmodulatoren ab. Zurzeit werden der Östrogen-Rezeptorblocker Tamoxifen und verschiedene Aromatase-Inhibitoren standardmäßig in der Brustkrebstherapie eingesetzt (Palmieri et al. 2013). Dennoch ist diese Therapieform nicht immer erfolgreich und die Hemmung weiterer Enzyme erscheint sinnvoll. So stehen beispielsweise Sulfatase-Inhibitoren im Fokus der Forschung, welche ein Zunutzemachen der inaktiven sulfatierten Vorstufen verhindern könnten. Die Substanz STX64 (664 Coumate, Irosustat) wurde in zwei Phase-I-Studien an Brustkrebspatienten getestet und könnte als ergänzendes Therapeutikum zu Aromatase-Inhibitoren dienen (Stanway et al. 2006; Coombes et al. 2013). Eine weitere mögliche Option der Brustkrebstherapie könnte die Blockade der transportervermittelten Aufnahme von sulfatierten Vorstufen sein. In einer Dissertation an diesem Institut konnte eine Expression von SOAT in Brusttumoren nachgewiesen werden (Funk 2009). Eine SOAT-transfizierte hormonsensitive Brustzelllinie T47D zeigte zudem eine erhöhte Zellproliferation nach Inkubation mit E₁S, wie es auch in hormonabhängigen Brusttumoren vorkommt. Dieser Effekt konnte durch Inkubation mit den oben beschriebenen Stoffen, dem Östrogen-Rezeptorblocker Tamoxifen und dem Sulfatase-Inhibitor STX64, verhindert werden. Doch auch die Inkubation mit den SOAT-Inhibitoren 2-

und 4-SMP konnte die erhöhte Proliferation aufheben (Karakus 2009). Dies bestätigt, dass auch die Hemmung von Steroidsulfattransportern wie SOAT ein Baustein in der Brustkrebstherapie darstellen könnte.

Als weiteres am Reproduktionsgeschehen beteiligtes Organ weist die Plazenta eine SOAT-Expression auf, jedoch ist die genaue Lokalisierung unbekannt. In isolierten mononukleären Trophoblasten erfolgt eine natriumabhängige Aufnahme von DHEAS, die durch Steroidsulfate und BSP hemmbar ist (Ugele und Simon 1999; Ugele et al. 2003). Möglicherweise ist der natriumabhängige Transporter SOAT hier an der DHEAS-Aufnahme beteiligt. Die Lokalisierung von SOAT in der Plazenta ist ein Gegenstand dieser Arbeit.

1.5 Die Familie der SLCO-Transporter

1.5.1 Eigenschaften der SLCO-Familie

Die *Organic Anion Transporting Polypeptides* (OATPs) sind Transporter, die in der SLCO-Familie (SLC21-Familie) zusammengefasst werden. Sie vermitteln die Aufnahme von amphipathischen organischen Anionen mit einer Molekularmasse über 300 Da. Einige Substrate sind allerdings auch Kationen oder ungeladene Moleküle (Hagenbuch und Stieger 2013). Amphipathische Moleküle enthalten sowohl einen polaren hydrophilen, als auch einen unpolaren lipophilen Teil. In das Substratspektrum der OATPs zählen Gallensäuren, Steroidkonjugate, Schilddrüsenhormone, Xenobiotika und verschiedene Medikamente, die sie unabhängig von Natrium aufnehmen (Hagenbuch und Stieger 2013). Mit ihrer natriumunabhängigen Transportaktivität unterscheiden sie sich deutlich von der zuvor beschriebenen natriumabhängigen SLC10-Familie. Die Nomenklatur für die Benennung der Transporter ist auf die Unterteilung in Familien und Unterfamilien ausgerichtet. Es existieren sechs Familien (OATP1-OATP6) und 13 Unterfamilien (OATP1A, OATP1B usw.). Die einzelnen Mitglieder der Unterfamilien sind jeweils in der Reihenfolge ihrer Identifizierung benannt, z. B. OATP1A2 als zweites identifiziertes Protein aus der Unterfamilie OATP1A. Die Proteinnamen werden wie beschrieben als OATP angegeben, der Genname als *SLCO* mit gleicher Nummerierung wie die Proteine, z.B. *SLCO1A2* (Hagenbuch und Meier 2004). Inzwischen sind elf humane OATPs bekannt (Hagenbuch und Stieger 2013).

Der Transportmechanismus der OATPs ist noch nicht vollständig geklärt, es wird jedoch angenommen, dass es sich um organische Anionen-Austauscher handelt (Hagenbuch und Stieger 2013). In einzelnen Ratten-Oatps dienen Glutathion oder Glutathion-Konjugate als Gegenion für Taurocholat (Li et al. 1998, 2000). Leuthold et al. (2009) konnten Bicarbonat (HCO_3^-) als Gegenion für aufgenommene organische Anionen identifizieren. Zusätzlich bewirkt in 12 von 13 getesteten OATPs von Mensch und Ratte eine Senkung des

extrazellulären pH-Wertes eine Stimulation der Substrataufnahme und eine Senkung der Michaeliskonstante, was eine erhöhte Affinität des Transporters gegenüber dem Substrat bedeutet. Die erhöhte Aufnahme geht mit einem gesteigerten Efflux von Bicarbonat einher, das mit extrazellulären Protonen zu H_2O und CO_2 neutralisiert wird. Der damit erreichte auswärts gerichtete Bicarbonatgradient erleichtert wiederum die Aufnahme von Substraten in die Zelle. Ein saures Mikroklima um die OATPs führt somit zu einer verbesserten Substrataufnahme (Leuthold et al. 2009).

1.5.2 OATPs in der humanen Plazenta

In der humanen Plazenta befinden sich die Transporter OATP2B1, OATP1A2 und OATP4A1 (Tamai et al. 2000; Patel et al. 2003). Da dem OATP2B1 aufgrund seiner Lokalisation und seines Substratspektrums eine besondere Rolle bei der Versorgung der Plazenta mit Steroidsulfathormonen zukommt, wird diesem Transporter ein eigenes Kapitel (1.5.3) gewidmet.

OATP1A2 wurde in Synzytiotrophoblasten, Zytotrophoblasten und in extravillären Trophoblasten immunhistochemisch nachgewiesen (Loubière et al. 2010). OATP4A1 hingegen wurde membranständig in der apikalen Membran von Synzytiotrophoblasten detektiert (Sato et al. 2003; Loubière et al. 2010). Beide Transporter enthalten sulfatierte Steroidhormone in ihrem Substratspektrum. OATP1A2 weist eine hohe Affinität gegenüber DHEAS auf (Kullak-Ublick et al. 1998) und transportiert mit geringerer Affinität E_1S (Bossuyt et al. 1996; Lee et al. 2005). Die höchste Expression dieses Transporters liegt im Gehirn vor, wo er in der Blut-Hirn-Schranke lokalisiert ist (Tamai et al. 2000; Lee et al. 2005; Bronger et al. 2005). Auch OATP4A1 transportiert E_1S , wobei hierfür nur eine geringe Transportaktivität festgestellt wurde. Er ist wahrscheinlich vor allem in den Schilddrüsenhormontransport involviert und zeigt eine breite Gewebeverteilung (Tamai et al. 2000). Der Transport von Schilddrüsenhormonen ist eine Gemeinsamkeit der beiden Transporter und sie beteiligen sich damit an der Versorgung der Plazenta und des Fetus mit maternalen Schilddrüsenhormonen (Fujiwara et al. 2001; van der Deure et al. 2010). Diese sind für das Wachstum des Fetus, vor allem des zentralen Nervensystems (Haddow et al. 1999; Pop et al. 2003; de Escobar et al. 2004) und für die normale Ausbildung der Plazenta, die mit Schilddrüsenhormon-Rezeptoren ausgestattet ist, von Bedeutung. Schilddrüsenhormonmangel geht mit Malplazentation einher, die zu Abortneigung oder intrauteriner Wachstumsretardierung (IUGR – *Intrauterine Growth Restriction*) führen kann (Kilby et al. 1998).

1.5.3 OATP2B1 (*SLCO2B1*) für die lokale Östrogenbereitstellung

Die Identifizierung von OATP2B1 (*SLCO2B1*) wurde im Jahr 2000 veröffentlicht und zeigt im Gegensatz zu anderen OATPs eine recht enge Substratspezifität, aber sehr breite Gewebeexpression (Tamai et al. 2000).

Substratspektrum

Substrate des OATP2B1 sind die Steroidsulfate E_1S , DHEAS und PREGS (Tamai et al. 2000; Kullak-Ublick et al. 2001; Grube et al. 2006a). Die Aufnahme von PREGS ist allerdings recht gering (Grube et al. 2006a) und DHEAS scheint nur ein schwaches Substrat zu sein (Pizzagalli et al. 2003). In stabil transfizierten OATP2B1-HEK293-Zellen zeigt der Vergleich der Michaeliskonstanten von E_1S und DHEAS eine etwa 10-fach höhere Affinität des Transporters zu E_1S als zu DHEAS, so dass E_1S ein Hauptsubstrat für OATP2B1 zu sein scheint (Ugele et al. 2008). Die Gallensäure Taurocholat wird nur unter sauren Bedingungen transportiert (Kobayashi et al. 2003; Nozawa et al. 2004). Weitere identifizierte Substrate sind Prostaglandin E_2 (Tamai et al. 2000), das Schilddrüsenhormon Thyroxin (Leuthold et al. 2009) und BSP (Kullak-Ublick et al. 2001). Zudem wurden einige Medikamente als Substrat des OATP2B1 identifiziert, beispielsweise Substanzen aus der Gruppe der Statine, bei denen es sich um Cholesterinsenker handelt (Roth et al. 2012).

Organverteilung und physiologische Bedeutung

OATP2B1 weist ein sehr breites Expressionsprofil auf und wurde in vielen Geweben auf mRNA-Ebene nachgewiesen (Tamai et al. 2000). In der Plazenta wurde das OATP2B1-Protein während der gesamten Gestation in der basalen Membran der Synzytiotrophoblasten und in der Membran von Zytotrophoblasten detektiert und ermöglicht dort die Aufnahme von Stoffen aus dem fetalen Blut (Abb. 1.4; St-Pierre et al. 2002). Aufgrund der niedrigen Affinität von OATP2B1 zu DHEAS scheint der Transporter in der Plazenta jedoch weniger an der Neusynthese von placentaren Östrogenen beteiligt zu sein, sondern vermittelt vornehmlich die Entfernung von Östrogensulfaten (E_1S) aus dem fetalen Blut. Die hohe Expression von Sulfatase im Synzytiotrophoblasten ermöglicht die vollständige Desulfatierung von E_1S und Freisetzung aktiver Östrogene (Ugele et al. 2008).

Die höchste mRNA-Expression wurde in der Leber detektiert, wo das OATP2B1-Protein in der basolateralen Membran der Hepatozyten lokalisiert ist (Kullak-Ublick et al. 2001). Zudem konnte das Protein in der apikalen Membran von Darmepithelzellen nachgewiesen werden (Kobayashi et al. 2003). An beiden Lokalisationen spielt die unter Kapitel 1.5.1 beschriebene gesteigerte Aufnahme von Substraten unter sauren Bedingungen eine besondere Rolle. An der apikalen Membran der Enterozyten herrscht ein saures Milieu, so dass neben den anderen bekannten Substraten auch die Gallensäure Taurocholat aufgenommen werden

kann. Auch an der basolateralen Membran der Hepatozyten wird ein saures Mikroklima diskutiert, welches über einen Na^+/H^+ -Austauscher aufrechterhalten wird (Kobayashi et al. 2003; Nozawa et al. 2004; Leuthold et al. 2009).

In der Brustdrüse wurde die Expression verschiedener Carrier für organische Anionen aus den Familien der OATPs und der *Organic Anion Transporter* (OATs) getestet. Hierbei wurde der OATP2B1 als der am höchsten exprimierte Carrier sowohl in normalem als auch in tumorösem Brustgewebe identifiziert und im Myoepithel detektiert, das die Duktusepithelzellen der Brustdrüse umgibt (Pizzagalli et al. 2003). In diesen Zellen ist bereits eine Expression der Sulfatase bekannt (Tobacman et al. 2002) und OATP2B1 könnte daher auch hier eine besondere Rolle bei der Versorgung von Zellen mit aktiven Östrogenen zukommen.

Aufgrund der ubiquitären Verteilung sowohl von OATP2B1 als auch von Sulfatase vermuten Ugele et al. (2008) eine generelle Bedeutung des Transporters für die Versorgung von Zellen mit aktiven Östrogenen, die über den Sulfataseweg aus sulfatierten Östrogenen zur Verfügung gestellt werden können. Weitere bereits bekannte Lokalisationen des OATP2B1-Proteins sind epidermale Keratinozyten (Schiffer et al. 2003), das Ziliarkörperepithel des Auges (Gao et al. 2005), Blutgefäßendothelzellen des Herzens (Grube et al. 2006b), die Zellmembran von Skelettmuskelzellen (Knauer et al. 2010) und Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (Bronger et al. 2005).

1.6 Die Familie der SLC22-Transporter

1.6.1 Überblick über die SLC22-Familie

Die SLC22-Familie enthält drei Typen von Transportern, die *Organic Cation Transporter* OCTs, die *Organic Zwitterion/Cation Transporter* OCTNs (auch *Novel Organic Cation Transporter*) und die *Organic Anion Transporter* OATs (Koepsell 2013). Da sulfatierte Steroide bei physiologischem pH-Wert negativ geladen vorliegen, fallen sie in das Transportspektrum der OATs. Gemeinsam ist den bisher charakterisierten OATs ihre breite Substratspezifität und der Austausch extrazellulärer und intrazellulärer Anionen (Burckhardt 2012). Viele OATs befinden sich in der Niere, so auch der OAT4, der aufgrund seiner zusätzlichen Lokalisation in der Plazenta hier näher beschrieben wird.

1.6.2 OAT4 (SLC22A11) als Anionenaustauscher in Niere und Plazenta

Die Isolierung des *Organic Anion Transporter 4* (OAT4, SLC22A11) aus der humanen Niere wurde im Jahr 2000 veröffentlicht (Cha et al. 2000) und der Transporter bisher außer beim Menschen auch bei Affen und Hunden nachgewiesen, nicht allerdings bei Nagern (Bleasby

et al. 2006). OAT4 ist ein Antiporter, der sowohl in die Aufnahme als auch Abgabe endogener Metaboliten und Xenobiotika involviert ist.

Substratspektrum

OAT4 vermittelt den Influx der sulfatierten Steroide E₁S und DHEAS (Cha et al. 2000). Messungen in *Xenopus*-Oocyten zeigten eine natriumunabhängige Aufnahme von E₁S (Cha et al. 2000), in stabil transfizierten OAT4-HEK293-Zellen hingegen war die Aufnahme von E₁S und DHEAS partiell natriumabhängig mit ca. 50 % niedrigeren Aufnahmeraten in Abwesenheit von Natrium (Hagos et al. 2007b; Ugele et al. 2008). Neben E₁S und DHEAS werden Urat (Hagos et al. 2007b), Prostaglandin E₂ und Prostaglandin F_{2α} (Kimura et al. 2002) aufgenommen. Des Weiteren findet ein Transport der Toxine Ochratoxin A (Cha et al. 2000) und Aflatoxin B1 (Tachampa et al. 2008) sowie von Medikamenten statt, beispielsweise von einigen Diuretika (Burckhardt 2012). Als Gegenion für die Aufnahme von organischen Anionen, gezeigt an den Beispielen Urat und E₁S, wurden im Zellinneren vorhandene Dicarboxylate (α -Ketoglutarat) oder Hydroxylionen (OH⁻) identifiziert (Ekaratanawong et al. 2004; Hagos et al. 2007b). Der Efflux von organischen Anionen, gezeigt für p-Aminohippurat, erfolgt gegen extrazelluläres E₁S oder Chloridionen. Aufgrund seiner unterschiedlichen Substratspezifität in Influx- und Efflux-Richtung, wird der OAT4 auch als asymmetrischer Antiporter bezeichnet (Hagos et al. 2007b).

Organverteilung und physiologische Bedeutung

Beim Menschen wird OAT4 stark in Niere und Plazenta exprimiert (Cha et al. 2000; Nishimura und Naito 2005; Bleasby et al. 2006), zusätzlich konnte eine Expression in der Nebenniere gezeigt werden (Steckelbroeck et al. 2004; Asif et al. 2005).

In der Niere ist OAT4 in der apikalen Membran proximaler Tubuluszellen lokalisiert und befindet sich somit an der lumenwärts gerichteten Seite der Zellen (Babu et al. 2002; Ekaratanawong et al. 2004). Er beteiligt sich an der Reabsorption von Substanzen aus dem Primärharn und nimmt organische Anionen, beispielsweise Urat oder E₁S aus dem Lumen im Austausch gegen im Zellinneren vorhandene Gegenionen auf (Hagos et al. 2007b). Zusammen mit dem ebenfalls in der apikalen Membran proximaler Tubuluszellen gelegenen Urat-Transporter URAT1 aus der gleichen Transporterfamilie spielt er eine wichtige Rolle im Aufrechterhalten der Urat-Homöostase. Urate sind die Salze der Harnsäure, die in höheren Primaten das Endprodukt des Nukleinsäureabbaus von Purinbasen darstellen, da ihnen das Enzym Urikase zum weiteren Abbau fehlt (Watanabe et al. 2002). Aufgrund der relativ hohen Rückresorption von Uraten in der Niere liegen bei Hominiden im Vergleich zu anderen Säugetieren recht hohe Urat-Plasma-Spiegel vor. Urate wirken als freie Radikalfänger, die den Körper und vor allem das Gehirn gegen oxidative Schäden schützen (Hooper et al. 2000). Ein weiterer evolutiver Vorteil liegt möglicherweise in der Fähigkeit, den Blutdruck

unter Aufnahme von Nahrung mit geringem Salzgehalt, aufrechtzuerhalten. Umgekehrt tragen Urate heutzutage, wo Mahlzeiten einen hohem Salzgehalt aufweisen, zur Entstehung von Bluthochdruck und kardiovaskulären Erkrankungen bei (Watanabe et al. 2002). Ein Ausfall von OAT4 oder dem Urat-Transporter URAT1 führt zu einer verminderten Urat-Rückresorption und damit zu einer erhöhten Urat-Ausscheidung über den Urin. Dies resultiert in einer Hypourikämie (Hagos et al. 2007b).

Zusätzlich zur Reabsorption von Anionen aus dem Primärharn kann OAT4 über seine Efflux-Funktion Stoffe in den Primärharn sezernieren, wenn diese zuvor von der Zelle durch Transporter an der basalen Membran aus dem Blut aufgenommen wurden. Ein bekanntes Efflux-Substrat ist p-Aminohippurat (Diagnostikum zur Untersuchung der Nierenfunktion), doch auch für andere Medikamente wird ein Efflux vermutet. Dies kann unter Berücksichtigung der Antiportereigenschaften von OAT4 unerwünschte Folgen nach sich ziehen. Eine Behandlung mit dem Schleifendiuretikum Torasemid oder mit Thiaziddiuretika, die über den OAT4 ins Lumen der Nierentubuli sezerniert und ausgeschieden werden, bewirkt eine erhöhte Aufnahme des Gegenions Urat aus dem Lumen und damit einen erhöhten Urat-Plasmaspiegel (Hagos et al. 2007a; 2007b). Ein Ausfallen von Natriumuraten kann zu Gicht führen, weshalb die Anwendung dieser Medikamente bei einer bestehenden Erkrankung vermieden werden sollte (Ratiopharm - Beipackzettel Torasemid 2011; Ratiopharm - Beipackzettel HCT 2012).

In der Plazenta ist OAT4 während der gesamten Gestation in der basalen Membran der Synzytiotrophoblasten und der Membran von Zytotrophoblasten lokalisiert und vermittelt die Entfernung von sulfatierten Steroiden und toxischen anionischen Substanzen aus dem fetalen Blut (Abb. 1.4; Cha et al. 2000; Ugele et al. 2003). Im Gegensatz zum Transporter OATP2B1 nimmt OAT4 DHEAS und E₁S gleichermaßen gut auf, so dass OAT4 eine wichtige Funktion in der Versorgung des Synzytiotrophoblasten mit geeigneten Vorstufen für die Östrogensynthese zukommt (Ugele et al. 2008). Da die fetale Niere und Leber nur eine geringe Kapazität für die Ausscheidung toxischer Substanzen haben, ist hierbei die Plazenta gefordert und OAT4 könnte daran mit seiner breiten Substraterkennung beteiligt sein (Cha et al. 2000). Zusätzlich wird eine wichtige Rolle von OAT4 in der Erhaltung der Urat-Homöostase der Plazenta diskutiert. Vor allem im ersten Trimester, wo antioxidative Enzymaktivitäten und Antioxidantien wie Glutathion gering vorhanden sind, könnte Urat den Fetus vor oxidativen Schäden schützen (Hagos et al. 2007b).

1.7 Die Chorionkarzinomzelllinie JEG-3

Ein Chorionkarzinom ist ein maligner Tumor der Trophoblastenzellen, der sehr früh metastasiert. Häufig geht ihm eine hydatiforme Mole voraus, es tritt aber auch nach Aborten, ektopischen Schwangerschaften oder sogar nach normalen Schwangerschaften auf (Haller 1999). Der Kultivierung einer für die Zellkultur geeigneten Zelllinie waren einige Schritte vorgeschaltet. Zunächst wurden Zellen einer Gehirnmastase, die von einem Chorionkarzinom abstammte, in die Backentasche von Hamstern transplantiert und über mehrere Jahre und Generationen kultiviert (Hertz 1959). Kohler und Bridson (1971) entwickelten daraus sechs verschiedene Chorionkarzinomzellklone, JEG 1-4 und 7-8. Diese produzieren hCG, humanes Plazentalaktogen, Progesteron und metabolisieren C19-Steroide in Östrogene (Kohler et al. 1971; Kohler und Bridson 1971). Der Klon Nr. 3 (JEG-3) hat sich am meisten durchgesetzt, da er die höchste hCG-Produktion zeigt und am effektivsten Estradiol aus DHEAS bildet (Kohler et al. 1971). JEG-3-Zellen exprimieren das Cholesterol-*side-chain-cleavage*-Enzym P450_{scc}, das unter Abspaltung der Seitenkette die Umwandlung von Cholesterol zu Pregnenolon vornimmt. Außerdem werden die Enzyme 3 β -HSD, 17 β -HSD, Sulfatase und Aromatase exprimiert, so dass die nötigen Enzyme für die Progesteron- und Östrogensynthese vorliegen (Samson et al. 2009). Für die Sulfatase ist in JEG-3-Zellen eine 10-fach niedrigere Aktivität im Vergleich zur Aktivität in Synzytiotrophoblasten bekannt, die damit den Werten in Zytotrophoblasten gleicht (Dibbelt et al. 1994). Auch morphologisch ähneln JEG-3-Zellen eher den Zytotrophoblasten, da sie keine Synzytien ausbilden.

Messungen an isolierten Trophoblasten und JEG-3-Zellen in Suspension zeigen, dass JEG-3-Zellen im Gegensatz zu Trophoblasten über einen Zeitraum von 30 Minuten nicht in der Lage sind, DHEAS aufzunehmen. Dies deutet darauf hin, dass JEG-3-Zellen eine verminderte Expression von Steroidsulfattransportern aufweisen (Ugele und Simon 1999). Durch stabile Transfektion von Transportern in JEG-3-Zellen sollten in dieser Arbeit verschiedene JEG-3-Zelllinien generiert werden, die jeweils einen Steroidsulfattransporter (SOAT, OATP2B1, OAT4) stabil exprimieren. In Kombination mit ihrer Fähigkeit zur Östrogensynthese sollten sie als Modell für humane Trophoblastenzellen dazu dienen, die Rolle der verschiedenen Steroidsulfattransporter für die Östrogensynthese der Plazenta zu beleuchten.

1.8 Zielsetzung

Die humane Plazenta bildet während der Schwangerschaft hohe Mengen an Östrogenen. Dazu verwendet sie sulfatierte Steroide aus dem fetalen und maternalen Blut, vor allem C19-Steroide wie DHEAS und 16 α -OH-DHEAS, um diese in Estron und Estradiol bzw. in Estriol umzuwandeln. Sulfatierte Steroide können allerdings nur mit Hilfe von Transportern in die Zellen gelangen. Diese Transporter standen im Zentrum dieser Arbeit, die folgende Ziele hatte:

1. Lokalisation des Steroidsulfattransporters SOAT: Eine mRNA-Expression von SOAT wurde in der humanen Plazenta detektiert, konnte allerdings bisher nicht eindeutig zellulär lokalisiert werden. Während Transporter auf der basalen Seite der Synzytiotrophoblasten bereits bekannt sind, die sulfatierte Steroide aus dem fetalen Blut aufnehmen, ist die Situation an der apikalen (maternalen) Membran noch ungewiss. Ob SOAT diese Aufgabe übernimmt, soll in dieser Arbeit untersucht werden.
2. Identifizierung der Transporter für die 16 α -OH-DHEAS-Aufnahme: Das fetale 16 α -OH-DHEAS dient als Vorstufe für die plazentare Synthese von Estriol, das als „Schwangerschaftshormon“ für die Evaluierung der fetalen Gesundheit herangezogen werden kann. In dieser Arbeit soll untersucht werden, welche Transporter die Aufnahme in die Synzytiotrophoblasten vermitteln.
3. Untersuchung der Rolle einzelner Transporter für die plazentare Östrogensynthese: Die von einem Chorionkarzinom abstammende Zelllinie JEG-3 besitzt alle Enzyme, um sulfatierte Östrogenvorstufen in Östrogene umzuwandeln. Allerdings sind JEG-3-Zellen im Vergleich zu Trophoblastenzellen vermindert mit Steroidsulfattransportern ausgestattet. Die Generierung von JEG-3-Zelllinien, die stabil die Steroidsulfattransporter SOAT, OATP2B1 und OAT4 exprimieren, soll Aufschluss darüber geben, welche Bedeutung den einzelnen Transportern für die plazentare Östrogensynthese zukommt.

2 MATERIAL

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

JEG-3-Zellen (CLS Cell Lines Services GmbH, Eppelheim)

Ursprung:	Humanes Chorionkarzinom (Plazenta)
Charakteristika:	Adhärent wachsend Produzieren humanes Choriongonadotropin (hCG), humanes Plazentalaktogen, Progesteron und können C19-Steroide in Östrogene umwandeln (Kapitel 1.7).

Flp-In T-Rex 293-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe)

Wirtszelllinie:	Human embryonic kidney cells 293 (HEK293)
Modifikation:	Stabile Integration einer <i>FRT site</i> (pFRT/ <i>lacZeo</i>) und eines Tetrazyklin-Repressors (pcDNA6/TR) in das Genom
Charakteristika:	Adhärent wachsend Zeocin-resistent → Selektion auf <i>FRT site</i> Blasticidin-resistent → Selektion auf Tetrazyklin-Repressor

Flp-In T-Rex 293-Zellen werden im weiteren Verlauf der Arbeit als FlpIn-HEK293-Zellen bezeichnet.

Stabil transfizierte HEK293-Zelllinien

FlpIn-HEK293-Zellen wurden in Verbindung mit dem Flp-In-System von Invitrogen zur Generierung verschiedener Transporter-exprimierender Zelllinien genutzt. Diese lagen bereits fertig vor:

Zelllinie	Expressionsvektor
SOAT-HEK293	SOAT-pcDNA5/FRT/TO
OATP2B1-HEK293	OATP2B1-pcDNA9/FRT/TO
OAT4-HEK293	OAT4-pcDNA5/FRT
NTCP-HEK293	NTCP-pcDNA5/FRT/TO
ASBT-HEK293	ASBT-pcDNA5/FRT/TO

Die SOAT-HEK293-Zellen wurden in Zusammenarbeit im Institut für Pharmakologie und Toxikologie (Gießen) und im Labor von Dr. B. Ugele (München) generiert (Geyer et al. 2007). Die OATP2B1-, und OAT4-HEK293-Zellen wurden im Labor von Dr. B. Ugele generiert, die NTCP- und ASBT-HEK293-Zellen am Institut für Pharmakologie und Toxikologie.

Der pcDNA5/FRT/TO- bzw. pcDNA9FRT/TO-Vektor enthalten vor dem zu transkribierenden Gen zwei Tetrazyklin-Operator 2 (TetO₂)-Sequenzen. An diese lagern sich jeweils ein

Tetrazyklin-Repressor-Homodimer an, die vom pcDNA6/TR-Vektor gebildet werden und die Transkription des Gens verhindern. Nach Zugabe von Tetrazyklin (1 µg/ml) führt dessen Anlagerung zu einer Konformationsänderung und Ablösung des Repressors. Das Gen kann nun transkribiert werden. Die Tetrazyklin-Induktion erfolgte idealerweise 72 h vor Versuchsbeginn (Döring 2010). Abweichend hiervon erfolgte die stabile Transfektion von OAT4 in Flp-In 293-Zellen ohne Tetrazyklin-Repressor, die somit keine Tetrazyklin-Induktion benötigen.

2.1.2 Vektoren

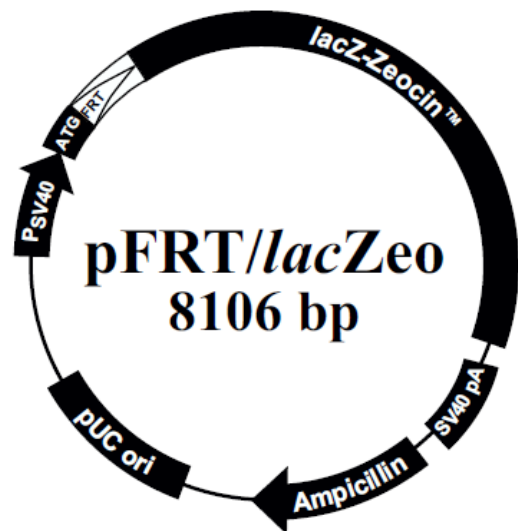
pFRT/lacZeo-Vektor

Flp Recombination Target (FRT) site: Bindungs- und Schnittstelle der Flp-Rekombinase

lacZ-Zeocin-Fusionsgen: Enthält das lacZ-Gen, das für die β-Galactosidase codiert, und das Zeocin-Resistenzgen für die Selektion stabil transfizierter Zellen

Ampicillin-Resistenzgen (β-Lactamase): Ermöglicht Selektion transformierter *E. coli*

(Invitrogen - Handbuch pFRT/lacZeo 2002)



pcDNA5/FRT-Vektor

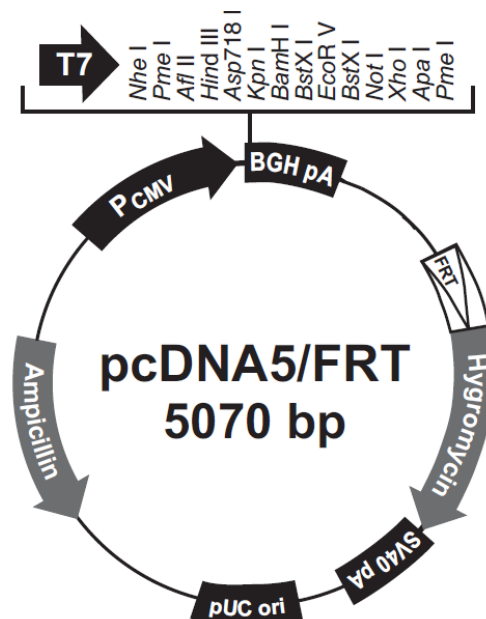
Multiple cloning site: Ermöglicht Einfügen des Wunschgens

FRT site

Hygromycin-Resistenzgen (ohne ATG): Ermöglicht Selektion stabil transfizierter Zellen, sobald der Vektor über die *FRT site* mit dem ATG-Codon und dem SV40-Promotor des pFRT/lacZeo-Vektors verbunden ist (Abb. 3.2)

Ampicillin-Resistenzgen

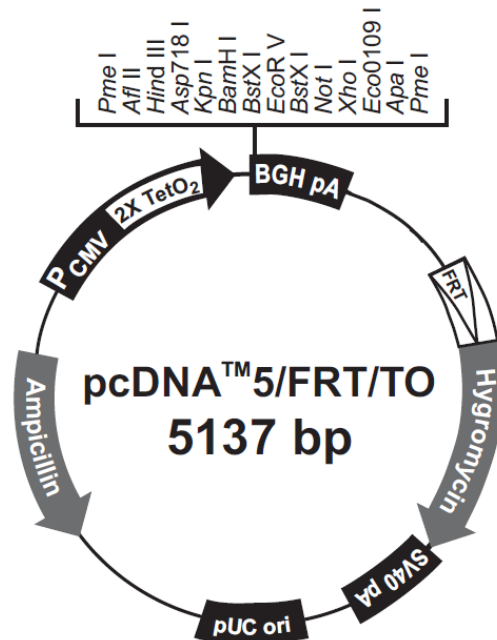
(Life Technologies - Handbuch pcDNA5/FRT 2012)



pcDNA5/FRT/TO-Vektor

wie pcDNA5/FRT mit 2 Tetrazyklin Operator 2 (TetO₂)-Sequenzen: Bindungsstelle für Tetrazyklin-Repressor-Homodimere

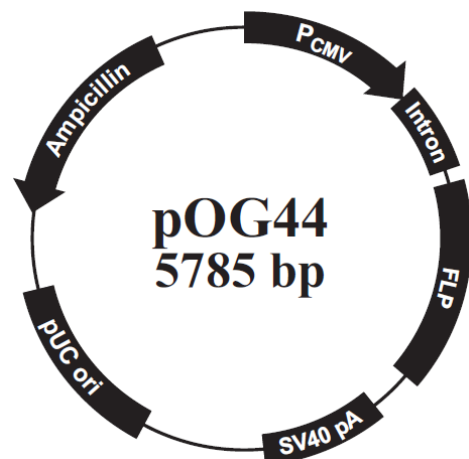
(Invitrogen - Handbuch pcDNA5/FRT/TO 2010)

**pOG44**

FLP: Codiert eine temperatursensitive FLP-Rekombinase, die Rekombination über *FRT sites* vermittelt

Ampicillin-Resistenzgen

(Life Technologies - Handbuch pOG44 2012)



Die Vektoren wurden von Invitrogen (Karlsruhe) erworben.

pcDNA9/FRT/TO (basierend auf pcDNA5/FRT und pcDNA4/TO)

Im Labor von Dr. B. Ugele (München) wurde der Vektor pcDNA5/FRT mit dem Tetrazyklin-Operon von pcDNA4/TO zusammengefügt; 5,07 kb Gesamtlänge.

2 TetO₂-Sequenzen, *Multiple cloning site*, *FRT site*, Hygromycin-Resistenzgen, Ampicillin-Resistenzgen

2.1.3 Zellkulturmedien und -lösungen

	Substanz	Menge	Endkonzentration
JEG-3-Medium (400 ml)	Ham's F12	324 ml	
	FKS	60 ml	15 %
	L-Glutamin [200 mM]	8 ml	4 mM
	Pen/Strep [10000 U/ml; 10000 µg/ml]	4 ml	1 %
	MEM Non-essential Amino Acids	4 ml	1 %
	Substanzen zusammengeben und Medium im Kühlschrank lagern.		
HEK293-Medium (400 ml)	DMEM High Glucose	174 ml	
	Ham's F12	174 ml	
	FKS	40 ml	10 %
	L-Glutamin [200 mM]	8 ml	4 mM
	Pen/Strep [10000 U/ml; 10000 µg/ml]	4 ml	1 %
	Substanzen zusammengeben und Medium im Kühlschrank lagern.		
PBS (1 l)	NaCl	8 g	137 mM
	KCl	0,2 g	2,68 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,3 g	7,3 mM
	KH ₂ PO ₄	0,2 g	1,47 mM
	ddH ₂ O	ad 1 l	
	Mit HCl auf pH 7,4 einstellen und autoklavieren.		
HEPES-Puffer (1 l)	HEPES	4,77 g	18 mM
	NaCl	7,07 g	120 mM
	KCl	0,4 g	5 mM
	KH ₂ PO ₄	0,06 g	0,4 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	0,08 g	0,3 mM
	Glucose	1 g	6 mM
	Phenolrot	0,01 g	0,03 mM
	EDTA-Dinatrium x 2 H ₂ O	0,37 g	1 mM
	ddH ₂ O	ad 1 l	
	Mit HCl/NaOH auf pH 7,4 einstellen, autoklavieren und im Kühlschrank lagern.		

Trypsinlösung (50 ml)	Trypsin EDTA (10 x) 0,5 %/ 0,2 % in DPBS (PAA)	5 ml	0,05 %/0,02 %
	HEPES-Puffer	45 ml	
Beschichtungsmedium	Poly-L-Lysin-Hydrobromid	5 mg	100 µg/ml
	PBS		50 ml
Trypanblau (100 ml)	Trypanblau	4 g	4 %
	NaCl	0,9 g	0,9 %
	ddH ₂ O	100 ml	

2.1.4 Antibiotika

Antibiotika	Verwendungszweck	Endkonzentration	Hersteller
Zeocin (100 mg/ml)	Selektion auf pFRT/lacZeo	10 µg/ml bei JEG-3 100 µg/ml bei HEK293	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Hygromycin B (50 mg/ml)	Selektion auf Insert	10-40 µg/ml bei JEG-3 150 µg/ml bei HEK293	Roth, Karlsruhe
Blasticidin S Hydrochlorid	Selektion auf pcDNA6/TR (Tetra- zyklin-Repressor)	15 µg/ml bei HEK293	Roth, Karlsruhe
Tetrazyklin Hydrochlorid	Induktion der Proteinexpression	1 µg/ml bei HEK293	Roth, Karlsruhe

2.2 Antikörper

Antikörper	Epitop	Spezies	Hersteller
Primärantikörper			
SLC10A6 C-13	C-Terminus SOAT	Polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
SOAT ₃₁₁₋₃₇₇	C-Terminus SOAT, Aminosäure 311-377	Polyklonal, Kaninchen	Die Herstellung des Antigens erfolgte von Dr. Jörg Alber und Kurt Stumpf an diesem Institut, die Generierung des Antikörpers von Eurogentec, Seraing, Belgien
Anti-GAPDH	C-Terminus GAPDH	Polyklonal, Ziege	Sigma, Saint Louis, MO, USA

Antikörper	Epitop	Spezies	Hersteller
Sekundärantikörper			
Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Kaninchen IgG	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Cappel Peroxidase-conjugated Goat IgG Fraction to Rabbit IgG	Kaninchen IgG	Ziege	MP Biomedicals, Singapur
Polyclonal Goat anti-Rabbit Immunoglobulins/ Biotinylated E0432	Kaninchen IgG	Ziege	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
ZyMAX Rabbit anti-Goat IgG (H+L)-HRP	Ziege IgG	Kaninchen	Invitrogen, Karlsruhe
Sonstige			
Anti-Digoxigenin-AP, Fab-fragments			Roche Diagnostics, Mannheim
Roti-Mark WESTERN HRP-Konjugat			Roth, Karlsruhe

2.3 Enzyme

2.3.1 Polymerasen

DNA-Polymerasen

AmpliTaq Gold DNA Polymerase (5 U/μl)	Applied Biosystems, hergestellt von Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA
Fast Start High Fidelity PCR-System	Roche Diagnostics, Mannheim

RNA-Polymerasen

SP6 RNA-Polymerase	Promega, Madison, WI, USA
T7 RNA-Polymerase	

Reverse Transkriptasen

MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/μl)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

2.3.2 Restriktionsenzyme

BamHI (20 U/μl)	NEB, Ipswich, MA, USA
ScaI (10 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
XhoI (20 U/μl)	NEB, Ipswich, MA, USA

2.3.3 DNasen und RNasen

DNase I, RNase-free (1 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNase I recombinant, RNase-free (10 U/μl)	Roche Diagnostics, Mannheim
Ribonuclease A from bovine pancreas (RNase A)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ribonuclease T1 from <i>Aspergillus oryzae</i> (RNase T1)	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.4 Real-Time qRT-PCR

TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA):

Gen	Assay	Gen	Assay
β-Aktin	Hs01060665_g1	OSCP1	Hs00376771_m1
	Hs99999903_m1	OSTα	Hs00380895_m1
SOAT	Hs01399354_m1	BCRP	Hs00184979_m1
NTCP	Hs00161820_m1	Androgenrezeptor	Hs00171172_m1
ASBT	Hs00166561_m1	Östrogenrezeptor α	Hs00174860_m1
OATP1A2	Hs00366488_m1	Östrogenrezeptor β	Hs00230957_m1
OATP3A1	Hs00203184_m1	Sulfatase	Hs00165853_m1
OATP4A1	Hs00249583_m1	Aromatase, CYP19A1	Hs00240671_m1
OATP2B1	Hs00200670_m1	Hum. Plazentalaktogen 1	Hs01862611_g1
OATP1C1	Hs00213714_m1	Hum. Plazentalaktogen 2	Hs00831897_s1
OAT3	Hs00188599_m1	hCG	Hs00361224_gH
OAT4	Hs00945829_m1	CYP3A4	Hs00604506_m1
OAT7	Hs00971064_m1	CYP3A7	Hs00426361_m1
GST	Hs00542846_m1	CYP17A1	Hs01124136_m1

Assay-Nomenklatur:

- Hs: Hs: Homo sapiens
- _m: Sonde überspannt Exongrenze zweier benachbarter Exone, genomische DNA wird nicht detektiert.
- _s: Sonde und Primer liegen innerhalb eines Exons, genomische DNA wird detektiert.
- _g: Genomische DNA könnte detektiert werden. Sonde und Primer könnten innerhalb eines Exons liegen.

Komponenten: Zwei unmarkierte Primer
FAM-markierte TaqMan MGB Sonde

TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA):

Komponenten: AmpliTaq Gold DNA Polymerase, UP (Ultra Pure)
Uracil-DNA-Glykosylase (UDG)
dNTPs mit dUTPs
Referenzfarbstoff ROX
Optimierte Pufferkomponenten

2.5 Kits

BCA Protein Assay Kit	Novagen (Merck KGaA), Darmstadt
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy FFPE Kit	Qiagen, Hilden
Universal Staining Kit AEC, Biotin/Streptavidin System	Biologo, Kronshagen
VECTASTAIN Elite ABC Kit	Biologo, Kronshagen

2.6 Kommerziell erhältliche Puffer, Lösungen und Reagenzien

5 x Transkriptions-Puffer (für RNA-Polymerasen)	Promega, Madison, WI, USA
6 x DNA Loading Dye (Ladepuffer)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
10 x DIG-RNA-Labeling-Mix	Roche, Basel, Schweiz
10 x DNA GOLD Buffer	Applied Biosystems, hergestellt von Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA
Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphoese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Denhardt's Solution 50x (BFP)	Sigma, Steinheim
Dithiothreitol, DTT (10 mM)	Promega, Madison, WI, USA
DMEM High Glucose	PAA, Pasching, Österreich
dNTPs (10 mM)	Applied Biosystems, hergestellt von Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA
EDTA-Lösung (pH 8; 0,5 M)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eosin G-Lösung, 0,5 % wässrig	Roth, Karlsruhe
FKS, fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich, Steinheim
Folin & Ciocalteu's Phenol Reagenz	Sigma, Taufkirchen
Fugene HD Transfection Reagent	Promega, Madison, WI, USA
GelRED	Biotium, Hayward, CA, USA
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Hämalaunlösung, sauer, nach Mayer	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylinlösung nach Gill II	Roth, Karlsruhe
Ham's F12	PAA, Pasching, Österreich
Hefe-tRNA (Ribonucleic acid, transfer from baker's yeast, <i>S. cerevisiae</i> , 10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaisers Glycergelatine	Merck, Darmstadt
Lachssperma-DNA (Deoxyribonucleic acid, single stranded from salmon testes, 9-11 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lithiumchloridlösung, 8 M	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA
Low Molecular Weight DNA Ladder	NEB, Ipswich, MA, USA
MEM Non-essential Amino Acids	Gibco, Carlsbad, CA, USA
MgCl ₂ (25 mM) für PCR	Applied Biosystems, hergestellt von Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA
NBT-BCIP	KPL, Gaithersburg, MD, USA
One Shot TOP10 Chemically Competent <i>E.coli</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Opti-MEM I	Gibco, Carlsbad, CA, USA
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
pCRII-TOPO-Vektor	Invitrogen, Karlsruhe
Ponceau S Solution	Sigma, Steinheim
ProLong Gold Antifade	Invitrogen, Karlsruhe

ProteoBlock Protease Inhibitor Cocktail
R09 One Shot B & W Film Developer
(1:5 in H₂O)
Random Hexamers (50 µM)

Rapid Fixer (1:25 in H₂O)
RIPA-Puffer
RNase-Inhibitor (20 U/µl)

RNase Inhibitor (40 U/µl)

Roti-Lumin 1 und 2
Roti-Mark WESTERN Marker
Roti-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
(25:24:1, pH 7,5-8)
Rotiszint 22 eco Szintillatoröl
S.O.C Medium
TRI-Reagent
Trypsin EDTA (10 x) 0,5 %/0,2 % in DPBS
Ziegenserum

MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Connect Chemicals, Vaihingen

Applied Biosystems, hergestellt von
Roche Molecular Systems, Branchburg,
NJ, USA

Ilford, Cheshire, England
Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Applied Biosystems, hergestellt von
Roche Molecular Systems, Branchburg,
NJ, USA

Applied Biosystems, Foster City, CA,
USA

Roth, Karlsruhe

Roth, Karlsruhe

Roth, Karlsruhe

Roth, Karlsruhe

Invitrogen, Karlsruhe

Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA

PAA, Pasching, Österreich

DAKO Cytomation, Hamburg

2.7 Chemikalien und Substanzen

16α-OH-DHEAS

6-Aminohexansäure
Agar-Agar, Kobe I, pulv. (Art.-Nr. 5210.3)
Agarose

Ammoniumsulfat, APS

Ampicillin

Blasticidin S Hydrochlorid

Bovines Serumalbumin, BSA

Bovines Serumalbumin, BSA Fraktion V

Bromosulphophthalein, BSP

Bromphenolblau

Calciumchlorid Dihydrat, CaCl₂ x 2 H₂O

Chloroform

Cholinchlorid

DAPI, 4', 6'-Diamidine-2'-Phenylindol
Dihydrochlorid

Dehydroepiandrosteron, DHEA

Dehydroepiandrosteron-3-sulfat, DHEAS

Deionisiertes Formamid

Dextran Coated Charcoal

Dextransulfat

D-Glucose

Diethylpyrocarbonat, DEPC

Dimethylsulfoxid, DMSO

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat,
Na₂HPO₄ x 2 H₂O

Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat,
Na₂HPO₄ x 7 H₂O

EDTA-Dinatrium x 2 H₂O

Naxxar, Malta; Steraloids, Newport, RI,
USA

Roth, Karlsruhe

Roth, Karlsruhe

Roth, Karlsruhe

Serva, Heidelberg

Sigma, Taufkirchen

Roth, Karlsruhe

Sigma, Steinheim

Sigma, Steinheim

Sigma, Steinheim

Serva, Heidelberg

Merck, Darmstadt

Roth, Karlsruhe

Sigma, Taufkirchen

Roche, Mannheim

Sigma, Steinheim

Sigma, Steinheim

Sigma, Steinheim

Sigma, Steinheim

Roth, Karlsruhe

Merck, Darmstadt

Roth, Karlsruhe

Roth, Karlsruhe

Merck, Darmstadt

Merck, Darmstadt

Boehringer Ingelheim, Heidelberg

Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Essigsäureanhydrid	Merck, Darmstadt
Estron-3-sulfat, E ₁ S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol (> 99,8 %)	Roth, Karlsruhe
Formamid	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Fluka, Steinheim; Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt, pulv., für die Bakteriologie (Art.-Nr. 2363.3)	Roth, Karlsruhe
HEPES, N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- Ethansulfonsäure	Roth, Karlsruhe
Hygromycin B (50 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Immersion liquid Typ N (Öl für Mikroskopie)	Leica, Wetzlar
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid, KCl	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid, KOH	Merck, Darmstadt
Kalium-Natrium-Tartrat	Merck, Darmstadt
Kupfer(II)sulfat Pentahydrat, CuSO ₄ x 5 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Levamisol-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin (200 mM)	Gibco, Karlsruhe; PAA, Pasching
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat, MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver, blotting grade, pulv., fettarm (Art.-Nr. T145.1)	Roth, Karlsruhe
Mineralöl für Molekularbiologie	Sigma, Steinheim
Natriumacetat Trihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat, Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, NaCl	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO ₃	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid, NaOH	Roth, Karlsruhe
o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid, ONPG	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd, PFA	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd, PFA 4 % in PBS 7,4	Süsse Labortechnik, Gudensberg
PBS Tabletten	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin (10000 Units/ml; 10000 µg/ml)	Gibco, Karlsruhe; PAA, Pasching
Phenolrot	Sigma, Deisenhofen
Poly-L-Lysin Hydrobromid	Sigma, Taufkirchen
Proteinase K	Sigma, Steinheim
Salzsäure, HCl, 32 %	Roth, Karlsruhe
Sodium Dodecylsulfat, SDS	Sigma, Taufkirchen
Stickstoff, flüssig, N ₂	Messer, Griesheim
TEMED, N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin	Serva, Heidelberg
Tetrazyklin Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Triethanolamin	Sigma, Steinheim
Trinatriumcitrat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Fluka, Seelze
Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut, für die Mikrobiologie	Roth, Karlsruhe

Tween 20, Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat	Roth, Karlsruhe
Wasser für die Molekularbiologie	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30 %	Roth, Karlsruhe
Xylol ≥99 %	Roth, Karlsruhe
Zeocin (100 mg/ml)	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Zitronensäure Monohydrat	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

2.8 Radioaktiv markierte Substanzen

Substanz	Spezifische Aktivität (Ci/mmol)	Konzentration (μM)	mCi/ml	fmol/dpm
³ H]DHEAS	51,2	19,53	1	0,00887793
	70,5	14,18	1	0,00644752
³ H]E ₁ S	54,3	18,42	1	0,00837109
	45,6	21,93	1	0,00832509

Die Substanzen wurden von PerkinElmer (Boston, MA, USA) erworben.

2.9 Geräte

Analysewaagen:

AE 260 Delta Range
C-30 Microbalance

Mettler-Toledo, Gießen
Cahn Instruments, Cerritos, CA,
USA

Precisa 3000C-6000D
Autoklav: Systec 3150 EL

DAK-Oerlikon, Zürich
Systec, Wetztenberg
Integra Biosciences, Fernwald
Roth, Karlsruhe

Brenner: Fireboy eco
Bürker Zählkammer

CO₂-Inkubatoren:

Modell CO-24, Modell CO27

New Brunswick Scientific, Edison,
NJ, USA

Model NU-4750

NuAire, Plymouth, MN, USA

Elektroblotter: PerfectBlue 'Semi Dry'-Blotter Sedec M
20 cm x 20 cm

PeqLab, Erlangen

Elektrophorese-Gelschlitten: 12 x 18 cm; 7,5 x 5 cm

Werkstatt MZI, Gießen

Elektrophorese-Kammern:

14,5 x 6,5 cm; 35,5 x 11,0 cm

Werkstatt MZI, Gießen

PerfectBlue Doppelgelsystem Twin L, 20 cm x 20 cm

PeqLab, Erlangen

Elektrophorese-Spannungsgeber:

Electrophoresis Power Supply EPS600

Pharmacia Biotech,
Buckinghamshire, UK

Spannungsgeber (0-200 mA, 1 kV, 150 W)

Werkstatt MZI, Gießen

Flüssigkeitsszintillationszähler: Wallac 1409

Pharmacia, Freiburg

Hybridisierungssofen: HB-1000 Hybridizer mit
Stripping-Röhrchen

UVP Upland, CA, USA

Image Master

Amersham Pharmacia Biotech,
Buckinghamshire, UK

Inkubator-Schüttler: G24 Environmental Incubator
shaker

New Brunswick Scientific,
Edison, N.J., USA

Laminar Flows:

DanLAF VFR 1806

Claus Damm, Fredensborg,
Dänemark

NU-437-500-E Clean Air Nsf 49	NuAire, Plymouth, MN, USA Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Magnetrührer: IKA-Combimag RCO IKAMAG RCT	IKA, Staufen IKA, Staufen
Mikroskope: DM5500B Fluoreszenzmikroskop Kamera DFC340FX Software LAS AF 6000 mit 3D Deconvolution; Software LAS V3.8 Fluovert SM-Lux ICC50 HD PALM MicroBeam mit PALM Robo Software	Leica, Wetzlar Leitz, Wetzlar Leitz, Wetzlar Leica, Wetzlar Zeiss, Oberkochen
pH-Meter: HI 221 Calibration Check Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Photometer: BioPhotometer Benchmark Microplate Reader GloMax-Multi+ Detection System	Eppendorf, Hamburg Bio-Rad, München Promega, Madison, WI, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg; Gilson, Den Haag, Niederlande; Biohit, Rosbach
Pipettierhilfen: Pipetboy acu Gilson Pipetting Aid	Integra Biosciences, Fernwald Gilson, Den Haag, Niederlande
QIAvac 24 Plus Vakuumvorrichtung	Qiagen, Hilden
Rotationsmikrotom RM 2125 RT	Leica, Wetzlar
Taumler: Heidolph Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Thermocycler: Thermocycler Primus 96 advanced gradient MJ Mini Personal Thermal Cycler 7300 Real Time PCR System	PeqLab, Erlangen Bio-Rad, Hercules, CA, USA Applied Biosystems, Darmstadt
UV-Crosslinker: Stratalinker UV Crosslinker 1800	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Vakuumpumpen: Divac 2.4L N86KN.18	Leybold, Köln KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Vortexer: Vortex VF 2	Janke und Kunkel, Staufen
Wärmeplatten	LKB, Bromma, Schweden, Werkstatt MZI Memmert, Schwalbach
Wärmeschränk	
Wasserbäder: WB7 SW21 (Schüttelwasserbad) GFL 1083 (Schüttelwasserbad)	Memmert, Schwalbach Julabo, Seelbach Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
TFB 45 (Streckwasserbad)	Medite Medizintechnik, Burgdorf
Zentrifugen: Kühlzentrifuge 5417R Tischzentrifuge 5415D Tischzentrifuge 5415 Centrifuge/Vortex Combispin FVL-2400	Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg PeqLab, Erlangen

2.10 Verbrauchsmaterial

Dako Pen
Deckgläschen, Ø 12 mm
Einmalhandschuhe: Latex, Nitril
Faltenfilter MN 615 1/4, Ø 18,5 cm
Gel-Blotting-Papier
Kanülen: Sterican 20Gx1½, Länge 40 mm Gr. 1
Kryoröhrchen: CryoPure Gefäß 1,6 ml
Minivials

Multiwell-Platten:

6, 12, 24 Wells (Zellkultur)
96-Well Mikroplatten

MicroAmp Optical 96 well Reaction plate
Nitrozellulosemembran: Amersham Hybond ECL
(0,45 µm)

Objektträger:

Standard
MembraneSlide 1.0 PEN Objektträger

Pasteurpipetten

Petrischalen

Pipettenspitzen: 10 µl, 200 µl, 1000 µl, 1250 µl

Plastikfolie: Special autoclavable bags

Reaktionsgefäße:

1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml

Micro Tube 500

PCR-Tubes, 0,2 ml

RNase AWAY Reagent

RNaseZap Wipes

Röntgenfilm: Amersham Hyperfilm ECL-Film

Schraubdeckelgefäße: 8 ml, 15 ml, 25 ml

Serologische Pipetten: 5 ml, 10 ml, 25 ml

Sterilfilter: 0,22 µm

Uvetten

Zellkulturflaschen:

12,5 cm²

25 cm², 75 cm², 175 cm²

Zellkulturschalen: 100 x 20 mm

Glostrup, Dänemark
Roth, Karlsruhe
Roth, Karlsruhe
Machinery Nagel, Düren
Schleicher und Schuell, Dassel
Braun, Melsungen
Sarstedt, Nümbrecht
Perkin Elmer, Waltham, MA,
USA; Sarstedt, Nümbrecht

Greiner bio one, Frickenhausen
Roth, Karlsruhe; Sarstedt
Nümbrecht
Applied Biosystems, Singapur
GE Healthcare, Buckinghamshire,
UK

Roth, Karlsruhe
Zeiss, Jena
Roth, Karlsruhe
Nerbe plus, Winsen/Luhe
Sarstedt, Nümbrecht; Nerbe plus,
Winsen/Luhe
Nerbe plus, Winsen/Luhe

Sarstedt, Nümbrecht
Zeiss, Jena
ABgene, Epsom, UK
Ambion, Carlsbad, USA
Ambion, Carlsbad, USA
GE Healthcare, Buckinghamshire,
UK
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht

Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf, Hamburg

Becton Dickinson Falcon, Le Pont
De Claix, Frankreich
Sarstedt, Nümbrecht
Greiner bio one, Frickenhausen

2.11 „Rezepte“ für hergestellte Puffer und Lösungen

2.11.1 Ethanolpräzipitation

	Substanz	Menge	Endkonzentration
3 M Na-Acetat (100 ml)	Na-Acetat x 3 H ₂ O	40,8 g	3 M
	ddH ₂ O	ad 100 ml	
	Mit unverdünnter Essigsäure auf pH 5,2 einstellen.		

2.11.2 Agarose-Gelelektrophorese

	Substanz	Menge	Endkonzentration
10 x TAE-Puffer (1 l)	Tris	48,4 g	400 mM
	Essigsäure	11,4 ml	200 mM
	0,25 M EDTA, pH 8,0	40 ml	10 mM
	ddH ₂ O	ad 1 l	
	Tris in 800 ml ddH ₂ O lösen, Essigsäure und EDTA zugeben und mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen. Als 1 x TAE-Puffer verwenden (900 ml ddH ₂ O + 100 ml 10 x TAE-Puffer).		

Agarosegel (100 ml)	Agarose	1 bzw. 3 g	1 bzw. 3 %
	1 x TAE-Puffer	100 ml	
	Agarose in 1 x TAE-Puffer suspendieren, in Mikrowelle aufkochen und nach leichtem Abkühlen in Gelschlitten gießen.		

GeIRED Färbelösung (1 l)	ddH ₂ O	900 ml
	1 M NaCl	100 ml
	GeIRED (Biotium)	300 µl
	Substanzen mischen und in dunkler Flasche lichtgeschützt aufbewahren.	

2.11.3 Transformation kompetenter Zellen

	Substanz	Menge
LB-Medium (1 l)	Trypton/Pepton	10 g
	NaCl	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	ddH ₂ O	ad 1 l
	Autoklavieren und bei 4 °C lagern. Vor Gebrauch Selektionsantibiotikum (Ampicillin) hinzufügen.	

LB-Agar (1 l)	LB-Medium	1 l
	Agar-Agar	20 g
	Agar-Agar in LB-Medium (ohne Selektionsantibiotikum) lösen, autoklavieren und auf 60 °C abkühlen lassen. Selektionsantibiotikum (Ampicillin) hinzufügen und Platten gießen. Nach Aushärten des Agars Platten bei 4 °C lagern.	

2.11.4 RNA-Isolierung

	Substanz	Menge	Endkonzentration
DEPC-H₂O (1 l)	DEPC	1 ml	0,1 %
	ddH ₂ O	1 l	
	DEPC in ddH ₂ O unter Abzug pipettieren, über Nacht rühren lassen, anschließend autoklavieren.		

2.11.5 DNA-Isolierung

Methode mit Tri-Reagent

	Substanz	Menge	Endkonzentration
0,1 M Natriumcitrat/ Ethanol (50 ml)	Trinatriumcitrat x 2 H ₂ O	1,47 g	0,1 M
	DEPC-H ₂ O	45 ml	
	Ethanol	5 ml	10 %

800 mM NaOH	NaOH-Pellet	Pellet wog 0,246 g	800 mM
	ddH ₂ O	7,67 ml	
	NaOH-Pellet in ddH ₂ O lösen. Vor Gebrauch benötigte Menge 1:100 in ddH ₂ O verdünnen, so dass 8 mM NaOH entstehen.		

0,1 M HEPES (10 ml)	HEPES	0,238 g	0,1 M
	ddH ₂ O	10 ml	
	Autoklavieren.		

0,1 M Na₂EDTA (50 ml)	EDTA-Dinatrium x 2 H ₂ O	1,862 g	0,1 M
	ddH ₂ O	50 ml	
	Mit NaOH (0,2 g NaOH-Pellet) auf pH 8 einstellen und autoklavieren.		

2.11.6 β -Galactosidase-Assay

	Substanz	Menge	Endkonzentration
Tris-Lysepuffer (20 ml)	Tris	0,606 g	0,25 M
	ddH ₂ O	ad 20 ml	
	Mit HCl auf pH 8 einstellen und autoklavieren.		

10 x Cleavage-Puffer (50 ml)	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	8,04	0,6 M
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	2,76 g	0,4 M
	KCl	0,373 g	0,1 M
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,123 g	0,01 M
	ddH ₂ O	ad 50 ml	
	Substanzen in ddH ₂ O geben, zum Lösen erwärmen und Lösung auf pH 7 einstellen. Autoklavieren und bei 4 °C lagern. Als 1 x Cleavage-Puffer verwenden (90 ml ddH ₂ O + 10 ml 10 x Cleavage Puffer) und zu 100 ml 1 x Cleavage-Puffer 270 μ l β -Mercapto-ethanol geben.		

ONPG	ONPG	16 mg	4 mg/ml
	ddH ₂ O	4 ml	
	ONPG in ddH ₂ O lösen.		

Stopp-Puffer (110 ml)	Na ₂ CO ₃	11,66 g	1 M
	ddH ₂ O	ad 110 ml	
	Autoklavieren.		

2.11.7 Transportmessungen an Zellen

	Substanz	Menge	Endkonzentration
Transportpuffer mit Na⁺ (1 l)	NaCl	8,35 g	142,9 mM
	KCl	0,35 g	4,7 mM
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,296 g	1,2 mM
	KH ₂ PO ₄	0,163 g	1,2 mM
	HEPES	4,777 g	20 mM
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,264 g	1,8 mM
	ddH ₂ O	ad 1 l	
	pH mit KOH auf 7,4 einstellen. Im Kühlschrank lagern.		

Transportpuffer ohne Na⁺ (1 l)	Cholinchlorid	19,95 g	142,9 mM
	KCl	0,35 g	4,7 mM
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,296 g	1,2 mM
	KH ₂ PO ₄	0,163 g	1,2 mM
	HEPES	4,777 g	20 mM
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,264 g	1,8 mM
	ddH ₂ O	ad 1 l	
	pH mit KOH auf 7,4 einstellen. Bei -20°C lagern.		

NaOH-SDS-Lysepuffer (1 l)	NaOH	40,01 g	1 N
	SDS	1 g	1 %
	ddH ₂ O	ad 1 l	
	Bei 37 °C lagern.		

Szintillationsflüssigkeit (6,6 l)	Isopropanol	300 ml
	ddH ₂ O	300 ml
	Rotiszint 22 eco Szintillatoröl	6000 ml
	Substanzen in Szintillatorfass zusammengeben und durch vorsichtiges Rollen des Fasses mischen.	

2.11.8 Proteinbestimmung

Methode nach Lowry

	Substanz	Menge	Endkonzentration
Stammlösung für Proteinstandardreihe	BSA (bovines Serumalbumin, Cohn Fraktion V)	2 mg	2 mg/ml
	Lysepuffer (siehe Kapitel 2.11.7)	1 ml	
	BSA in Lysepuffer lösen. Zum Erstellen der Proteinstandardreihe nutzen (0-800 µg/ml).		

Lösung C (für 100 Wells)	4 % Na ₂ CO ₃	20 ml
	1 % CuSO ₄	0,8 ml
	2 % K-Na-Tartrat	0,8 ml
	Lösungen vermischen. 200 µl pro Well einsetzen.	

Folin-Lösung (für 100 Wells)	Folin & Ciocalteu's Phenol Reagenz	1 ml
	ddH ₂ O	3 ml
	Folin mit ddH ₂ O vermischen. 40 µl pro Well einsetzen.	

2.11.9 Immunfluoreszenz

	Substanz	Menge	Endkonzentration
10 x PBS (1 l)	NaCl	80 g	1370 mM
	KCl	2 g	27 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	26,8 g	100 mM
	Na ₂ PO ₄	2,4 g	18 mM
	ddH ₂ O	ad 1 l	
	Mit HCl auf pH 7,4 stellen. Autoklavieren. Als 1 x PBS verwenden (900 ml ddH ₂ O + 100 ml 10 x PBS).		

2 % PFA (200 ml)	PFA	4 g	2 %
	ddH ₂ O (50-60 °C)	180 ml	
	10 x PBS	20 ml	
	PFA in erwärmtem ddH ₂ O lösen, wird milchig. Wenig 1 M NaOH zugeben, bis Lösung klar wird. 10 x PBS zugeben und pH mit HCl auf 6,8-7,2 einstellen. Bei -20 °C lagern.		

Puffer A (110 ml)	Glycin	165,22 mg	20 mM
	1 x PBS	110 ml	
	Glycin in PBS lösen.		

Puffer A + Triton X-100	Puffer A	20 ml
	Triton X-100	40 µl
	Triton X-100 in Puffer A geben.	

Blockierlösung (66 ml)	BSA	660 mg	1 %
	Puffer A	66 ml	
	Ziegenserum	2,64 ml	4 %
	BSA in Puffer A lösen. Ziegenserum zugeben.		

DAPI/Methanol 1:5000	DAPI (1 mg/ml in ddH ₂ O)	50 µl
	Methanol	250 ml
	DAPI in Methanol lösen.	

2.11.10 Western Blot

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

	Trenngel 8,2 % (45,8 ml)	Sammelgel 4 % (15 ml)
ddH ₂ O	20,05 ml	9,06 ml
1,5 M TrisHCl, pH 8,8	12,5 ml	-
0,5 M TrisHCl, pH 6,8	-	3,75 ml
10 % SDS	500 µl	150 µl
30 % Acrylamid/Bisacrylamid Mix	12,5 ml	1,95 ml
10 % APS	250 µl	75 µl
TEMED	25 µl	15 µl

Substanzen nacheinander unter gelegentlichem Schwenken in ein Becherglas geben. APS und TEMED starten die Polymerisation, so dass das Gel zügig nach Zugabe dieser beiden Substanzen gegossen werden sollte.

	Substanz	Menge	Endkonzentration
4 x Lämmli-puffer (10 ml)	SDS	0,8 g	8 %
	Glycerin	4 g	40 %
	β-Mercaptoethanol	2 ml	20 %
	Bromphenolblau	0,8 mg	0,008 %
	1 M Tris, pH 6,8	2,5 ml	0,25 M
	ddH ₂ O	ad 10 ml	

10 x Tris-Glycin- SDS- Elektrophorese- puffer (1 l)	Tris	30,3 g	250 mM
	Glycin	144 g	1920 mM
	SDS	10 g	1 %
	ddH ₂ O	ad 1 l	
	Als 1 x Elektrophoresepuffer verwenden (900 ml ddH ₂ O + 100 ml 10 x Elektrophoresepuffer).		

Kathodenpuffer (500 ml)	6-Aminohexansäure	2,62 g	40 mM
	Tris	1,51 g	25 mM
	Methanol	100 ml	20 %
	ddH ₂ O	ad 500 ml	
	6-Aminohexansäure und Tris in etwas ddH ₂ O lösen, Methanol zugeben und mit ddH ₂ O auf 500 ml auffüllen.		

Anodenpuffer (500 ml)	Tris	1,82 g	30 mM
	Methanol	100 ml	20 %
	ddH ₂ O	ad 500 ml	
	Tris in etwas ddH ₂ O lösen, Methanol zugeben und mit ddH ₂ O auf 500 ml auffüllen.		

Konzentrierter Anodenpuffer (500 ml)	Tris	18,2 g	300 mM
	Methanol	100 ml	20 %
	ddH ₂ O	ad 500 ml	
	Tris in etwas ddH ₂ O lösen, Methanol zugeben und mit ddH ₂ O auf 500 ml auffüllen.		

10 x TBS (1 l)	NaCl	80 g	1370 mM
	Tris	12,1 g	100 mM
	ddH ₂ O	ad 1 l	
	Mit HCl auf pH 8 einstellen. Bei 4 °C aufbewahren. Als 1 x TBS verwenden (900 ml ddH ₂ O + 100 ml 10 x TBS).		

1 x TBS-T (1 l)	1 x TBS	1 l	
	Tween 20	500 µl	0,05 %

Blockierlösung (100 ml)	1 x TBS-T	100 ml	
	Milchpulver	5 g	5 %
	Milchpulver in TBS-T lösen.		

Stripping-Puffer (400 ml)	SDS	8 g	2 %
	Tris-HCl	3,028 g	62,5 mM
	ddH ₂ O	ad 400 ml	
	Mit 50 mM Tris auf pH 6,7 einstellen. Beim Strippen 156,2 µl β-Mercaptoethanol auf 20 ml Stripping-Puffer einsetzen (=100 mM β-Mercaptoethanol).		

2.11.11 Immunhistochemie

	Substanz	Menge	Endkonzentration
10 x Tris-Puffer-Stammlösung (1 l)	Tris	60,5 g	500 mM
	ddH ₂ O	1 l	
	NaCl	87,7 g	1500 mM
	Tris in 800 ml ddH ₂ O lösen, mit HCl auf pH 7,6 einstellen. NaCl zugeben und auf 1 l auffüllen. Bei 4 °C lagern.		

1 x Tris-Waschpuffer (1 l)	10 x Tris-Puffer-Stammlösung	100 ml
	ddH ₂ O	900 ml
	Triton X-100	1 ml
	Flüssigkeiten zusammengeben.	

Citratpuffer			
Stammlösung A:	Zitronensäure x H ₂ O	4,2 g	0,1 M
	ddH ₂ O	200 ml	
Stammlösung B:	Trinatriumcitrat x 2 H ₂ O	29,41 g	0,1 M
	ddH ₂ O	1 l	
Gebrauchslösung:	7 ml Lösung A + 41 ml Lösung B auf 500 ml mit ddH ₂ O auffüllen.		

3 % H₂O₂ (60 ml)	30 % H ₂ O ₂	6 ml	3 %
	1 x Tris-Waschpuffer	54 ml	
	Die beiden Lösungen zusammengeben.		

1,4 % BSA-Blockierlösung (70 ml)	BSA	1 g	1,4 %
	1 x Tris-Waschpuffer	70 ml	
	BSA in Tris-Waschpuffer lösen.		

VECTASTAIN Elite ABC Kit (Biologo, Kronshagen)	1 x Tris-Waschpuffer	5 ml	
	Reagenz A	2 Tropfen	
	Reagenz B	2 Tropfen	
	Reagenz A und B in Tris-Waschpuffer geben.		

Universal Staining Kit AEC, Biotin/Streptavidin System (Biologo, Kronshagen)	Substratpuffer (aus Kit)	300 µl	
	AEC	1 Tropfen	
	Lösungen zusammengeben.		

2.11.12 In-situ-Hybridisierung

DEPC-H₂O	siehe RNA-Isolierung (Kapitel 2.11.4)
----------------------------	---------------------------------------

	Substanz	Menge	Endkonzentration
0,2 M HCl (250 ml)	25 % HCl	7,3 g	0,2 M
	DEPC-H ₂ O	ad 250 ml	

1 M MgCl₂ (400 ml)	MgCl ₂	81,4 g	1 M
	DEPC-H ₂ O	ad 400 ml	

PBSM (201 ml)	PBS Tablette	1	
	DEPC-H ₂ O	200 ml	
	1 M MgCl ₂	1 ml	5 mM
	PBS Tablette in DEPC-H ₂ O lösen und MgCl ₂ zugeben.		

20 x SSC Stammlösung für Tag 1 mit DEPC (1 l)	Trinatriumcitrat x 2 H ₂ O	88,23 g	0,3 M
	NaCl	175,29 g	3 M
	ddH ₂ O	ad 1 l	
	Mit HCl auf pH 7 einstellen.		
	DEPC	1 ml	0,1 %
	Nach Zugabe von DEPC kräftig schütteln, über Nacht in Trockenschrank (37 °C) stellen und anschließend autoklavieren. Als 20 x und 2 x SSC verwenden.		

20 x SSC Stammlösung für Tag 2 ohne DEPC (1 l)	Trinatriumcitrat x 2 H ₂ O	88,23 g	0,3 M
	NaCl	175,29 g	3 M
	ddH ₂ O	ad 1 l	
	Mit HCl auf pH 7 einstellen. Als 4 x, 2 x, 0,2 x, und 0,1 x SSC verwenden.		

Proteinase K Stammlösung	Proteinase K	10 mg	4 mg/ml
	PBSM	2,5 ml	
	Proteinase K in PBSM lösen, aliquotieren und bei -20 °C lagern.		

0,2 % Glycin (60ml)	Glycin	120 mg	0,2 %
	PBSM	60 ml	
	Glycin in PBSM lösen.		

0,25 % Essigsäure- anhydrid in Triethanolamin (10 mM)	Triethanolamin	149 mg	10 mM
	DEPC-H ₂ O	ad 100 ml	
	Essigsäureanhydrid	250 µl	0,25 %
	Triethanolamin in DEPC-H ₂ O lösen und Essigsäureanhydrid zugeben.		

20 % Glycerin (75 ml)	DEPC-H ₂ O	60 ml	
	Glycerin	15 ml	20 %

50 % Dextransulfat (10 ml)	Dextransulfat	5 g	50 %
	DEPC-H ₂ O	ad 10 ml	
	Dextransulfat in 5 ml DEPC-H ₂ O geben und einige Tage im Kühlschrank stehen lassen, bis es gelöst ist. Mit DEPC-H ₂ O auf 10 ml auffüllen. Aliquotieren und bei -20 °C aufbewahren.		

10 x RNase A/ RNase T1- Stammlösung (10 ml)	2 x SSC in DEPC	10 ml	
	RNase A (25 mg/ml)	120 µl	300 µg/ml
	RNase T1 (10 ⁵ U/ml)	1 µl	10 U/ml
	RNase A und T1 in 2 x SSC geben, aliquotieren und bei -20 °C aufbewahren. Vor Gebrauch 1,8 ml 4 x SSC + 200 µl 10 x RNaseA/ RNaseT1 zusammengeben.		

10 x TNMT (1 l)	Tris-HCl	121,2 g	0,77 M
	NaCl	58,4 g	1 M
	MgCl ₂	4,17 g	0,04 M
	ddH ₂ O	ad 1 l	
	Mit Tris auf pH 7,5 einstellen. 5 ml Triton X-100 zugeben. Als 1 x TNMT verwenden (90 ml ddH ₂ O + 10 ml 10 x TNMT).		

3 % BSA-Blockierlösung (20 ml)	BSA	0,6 g	3 %
	1 x TNMT	20 ml	
	BSA in TNMT lösen, aliquotieren und bei -20 °C aufbewahren.		

5 x NTB (1 l)	Tris-HCl	60,5 g	0,38 M
	NaCl	29,2 g	0,5 M
	ddH ₂ O	ad 1 l	
	Mit Tris auf pH 9,6 einstellen. Vor Gebrauch 20 ml 5 x NTB, 5 ml 1 M MgCl ₂ und 75 ml ddH ₂ O zusammengeben.		

1 M Levamisol (10 ml)	Levamisol-Hydrochlorid	2,4 g	1 M
	1 x NTB	10 ml	
	Levamisol in 1 x NTB lösen, aliquotieren und bei -20 °C aufbewahren.		

3 METHODEN

3.1 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmungen

Die zu messende DNA oder RNA wurde in ddH₂O verdünnt, in eine Küvette überführt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD₂₆₀) im Photometer (Eppendorf) bestimmt. Zur Bestimmung des Leerwertes wurde das Lösungsmittel der DNA bzw. RNA in gleichem Maße mit ddH₂O verdünnt.

Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{\text{OD}_{260} \times E \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000 \mu\text{l}}$$

E = Extinktionskoeffizient; E_{DNA} = 50 µg; E_{RNA} = 40 µg

Um eine Verunreinigung der DNA bzw. RNA mit Proteinen zu erkennen, wurde außerdem die optische Dichte bei 280 nm (OD₂₈₀) gemessen und mit der Absorption bei 260 nm ins Verhältnis gesetzt. Der Quotient von OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte für DNA zwischen 1,7 und 2,0 und für RNA über 1,8 liegen.

3.2 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Die Spaltung doppelsträngiger DNA erfolgte durch Restriktionsenzyme nach dem Protokoll des Herstellers. Dabei wurden in der Regel 1 µg Plasmid-DNA mit 10 U Restriktionsenzym (1 µl) und 2 µl zugehörigem Puffer in einem 20 µl Ansatz bei 37 °C über Nacht inkubiert. Für größere DNA-Mengen wurden die Volumina entsprechend hochgerechnet. Abweichend davon erfolgte das Linearisieren des pFRT/*lacZeo*-Vektors mit 50 µg Plasmid-DNA, 400 U des Enzyms Scal (40 µl) in einem 500 µl-Ansatz 2 h bei 37 °C. Die geschnittene DNA wurde auf einem Agarosegel analysiert und wenn nötig mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation aufgereinigt und konzentriert.

3.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient dem Aufreinigen nukleinsäurehaltiger Lösungen, bei der Proteine und andere Verschmutzungen entfernt werden. Das Prinzip beruht auf unterschiedlichen Löslichkeiten von Nukleinsäuren und Proteinen. Die zu reinigende wässrige Probe wird mit einer 1:1 Phenol-Chloroform-Mischung vermengt und durch Zentrifugation eine Phasentrennung herbeigeführt. Während sich Nukleinsäuren in der oberen wässrigen Phase sammeln, lösen sich Proteine in Phenol und befinden sich in der

unteren organischen Phase. Chloroform trägt aufgrund seiner hohen Dichte zu einer Dichteerhöhung der unteren Phase bei und schärft somit die Phasengrenze. In dieser Arbeit wurde Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) von Roth verwendet, wobei Isoamylalkohol ein Schäumen der Probe verhindern soll. 500 µl DNA-haltige Lösung wurde mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol vermennt, mittels Pulsvortexen (20 s) gemischt und anschließend 4 min bei 16 200 x g (13 200 rpm) zentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen: Eine obere wässrige Phase, welche die DNA enthielt, eine Interphase und eine untere organische Phase. Die obere nukleinsäurehaltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Aufreinigung wiederholt. Der wässrige DNA-enthaltende Überstand wurde mittels Ethanolpräzipitation konzentriert.

3.4 Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren

Zum Konzentrieren von in wässriger Lösung befindlicher DNA wurde diese mit 1/10 Volumenanteil 3 M Natrium-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Volumenanteilen 100%igem Ethanol vermennt und durch Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt. Die Probe wurde 1 h bei -20 °C gekühlt, während der die DNA präzipitierte. Anschließend wurde die DNA durch 30-minütiges Zentrifugieren bei 18 500 x g (13 200 rpm) und 4 °C pelletiert, zum Waschen mit 500 µl 70%igem Ethanol versetzt und erneut 15 min bei 18 500 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgezogen, das Pellet trocknen gelassen und in ddH₂O gelöst. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

3.5 Transformation kompetenter Zellen und Aufreinigung von Plasmid-DNA

3.5.1 Transformation

Das Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente TOP10 *E. coli* (Invitrogen) erfolgte über Hitzeschock-Transformation. Ein Aliquot *E. coli* wurde auf Eis aufgetaut, 1 µl Plasmid-DNA zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für genau 30 s, gefolgt von einer 2-minütigen Inkubation auf Eis. 250 µl S.O.C-Medium (Invitrogen), das auf 37 °C aufgewärmt war, wurde hinzugegeben und 1 h bei 37 °C und 225 rpm im Warmluftinkubator geschüttelt. 10 µl und 20 µl des Ansatzes wurden mit 80 µl S.O.C-Medium auf vorgewärmte LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und für 16 h bei 37 °C bebrütet. Das Ampicillin-Resistenzgen im transformierten Plasmid gewährleistete, dass sich nur Bakterien vermehrten, die das Plasmid aufgenommen hatten. Einzelne Bakterienkolonien wurden weiter vermehrt und die enthaltenen Plasmide über eine Midipäparation aus den Zellklonen aufgereinigt.

3.5.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA im Midi-Maßstab

Zur Vorbereitung wurden 4 ml LB-Ampicillin-Medium mit einer Bakterienkultur transformierter *E. coli* angeimpft und für 6 h bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. 50 ml LB-Ampicillin-Medium und 50 µl der Bakteriensuspension wurden bei 37 °C und 225 rpm im Warmluftinkubator über Nacht geschüttelt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem *QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit* nach Protokoll des Herstellers: Zunächst wurde die Bakteriensuspension in einem 50 ml Reaktionsgefäß bei 4300 x g pelletiert und in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Es folgte die Zugabe von Puffer P2, die Proben wurden durch Invertieren gemischt und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Zelllysate wurde mit 4 ml Puffer S3 versetzt, durch 4-6-maliges Invertieren gemischt und in ein *QIAfilter Cartridge* (Filterkartusche) überführt, worin es für 10 min inkubiert wurde. Währenddessen wurden die im Kit enthaltenen *Plasmid Plus Midi spin columns* (Zentrifugationssäulen) vorbereitet und mit Gefäßaufsätzen versehen auf die Vakuumvorrichtung *QIAvac 24 Plus* gesteckt. Anschließend wurde das Zelllysate mit einem Kolben aus der Filterkartusche in ein neues Reaktionsgefäß filtriert, 2 ml Puffer BB zugegeben, 4-6 Mal invertiert und das Lysat in die Zentrifugationssäulen gegeben. Durch Anschalten des Vakuums wurde die Flüssigkeit durch die Säulen gezogen, anschließend 0,7 ml ETR-Puffer zugegeben und die DNA unter Vakuum gewaschen. Dieser Waschschrift wurde mit 0,7 ml PE-Puffer wiederholt und die Proben anschließend bei 10 200 x g (10 500 rpm) für 1 min zentrifugiert, wobei restlicher Waschpuffer entfernt wurde. Um die DNA zu eluieren, wurden die Säulen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt, 200 µl ddH₂O auf die Säule gegeben, 1 min stehen gelassen und 1 min zentrifugiert. Die DNA gelangte hierbei in das Reaktionsgefäß und wurde bei -20 °C gelagert.

3.6 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA erfolgte aus Zellen sowie aus Proben, die durch *Laser-assisted cell picking* (LACP) aus Plazentagewebe gewonnen wurden. Ziel war es, die Expression von Genen nachzuweisen. Hierzu wurde Gesamt-RNA isoliert, bestehend aus ribosomaler RNA (rRNA), Transfer-RNA (tRNA) und *messenger* RNA (mRNA). Die RNA wurde einem DNase-Verdau unterzogen und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben, die als Template in einer PCR-Reaktion diente. Die genannten Schritte fanden bei Zellen und LACP-Proben nach unterschiedlichen Protokollen statt, die in den folgenden Kapiteln jeweils nacheinander erläutert werden.

Um die RNA vor den überall vorkommenden RNasen zu schützen, wurde der Arbeitsplatz vorher mit *RNaseZap Wipes* oder *RNase AWAY* Reagent (Ambion) gereinigt.

3.6.1 Gesamt-RNA-Isolierung aus Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus nativen und stabil transfizierten JEG-3-Zellen sowie aus stabil transfizierten HEK293 Zellen erfolgte mit TRI-Reagent von Sigma-Aldrich. Das Prinzip ähnelt dem der Phenol-Chloroform-Extraktion, ein saurer pH-Wert bewirkt jedoch das alleinige Lösen von RNA in der wässrigen Phase, während sich DNA in der Interphase und organischen Phase sammelt. TRI-Reagent enthält eine Mischung aus Guanidinthiocyanat und Phenol. Guanidinthiocyanat lysiert die Zellen und inaktiviert RNasen, während sich in Phenol DNA und Proteine lösen.

Etwa 5×10^6 Zellen wurden abtrypsiniert, in PBS gewaschen und durch Zentrifugieren pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml TRI-Reagent lysiert und bei -80°C maximal einen Monat aufbewahrt oder direkt weiterverarbeitet. Hierzu wurden die Proben 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und 200 μl Chloroform hinzugefügt. Durch energisches Schütteln für 15 s, 5-10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und anschließendes Zentrifugieren bei $11\,700 \times g$ (10 500 rpm) und 4°C für 15 min wurden drei Phasen herbeigeführt: Eine obere wässrige Phase mit RNA, eine Interphase mit DNA und eine untere rote organische Phase mit Protein. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß überführt, 500 μl Isopropanol hinzugegeben, gemischt und 5-10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Probe wurde 10 min bei $11\,700 \times g$ und 4°C zentrifugiert, wobei die RNA präzipitierte und sich als Pellet sammelte. Das Pellet wurde 2 x durch Zugabe von 1 ml 75%igem Alkohol, vortexen und 5-minütiger Zentrifugation bei $11\,700 \times g$ und 4°C gewaschen und anschließend bei geöffnetem Reaktionsgefäß unter dem Abzug trocknen gelassen. Die pelletierte RNA wurde in 20-40 μl RNase-freiem DEPC-ddH₂O gelöst und die Konzentration sowie die Reinheit im Photometer bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

3.6.2 Gesamt-RNA-Isolierung aus LACP-Proben

Die RNA-Isolierung aus Proben, die durch *Laser-assisted cell picking* (LACP) gewonnen wurden, erfolgte mit dem *RNeasy FFPE Kit* von Qiagen. Zunächst wurden die Proben mit 150 μl Lyse-Puffer PKD (*Proteinase K Digestion Buffer*) und 10 μl Proteinase K bei 55°C über Nacht inkubiert (max. 18 h), um Proteine abzubauen und Nukleinsäuren freizusetzen. Um Formalinverlinkungen in den freigesetzten Nukleinsäuren zu zerstören, schloss sich eine 15-minütige Inkubation bei 80°C im Wasserbad an. Daraufhin wurden 320 μl RBC-Puffer und 720 μl 100%iges Ethanol hinzugefügt, gemischt und 700 μl in die mitgelieferten Zentrifugationssäulen (*RNeasy MinElute spin columns*) überführt. Die Säulen wurden 15 s bei $10\,600 \times g$ (10 000 rpm) zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und der Schritt mit der restlichen Probe wiederholt. Die auf der Membran gebundene RNA wurde durch Zugabe von

500 µl RPE-Puffer und Zentrifugieren bei 10 600 x g für 15 s gewaschen, gefolgt von einem zweiten Waschschriff mit 500 µl RPE-Puffer und 2-minütiger Zentrifugation. Um die Membran zu trocknen, wurden die Säulen 5 min bei 20 800 x g (14 000 rpm) zentrifugiert und die RNA in 15 µl RNase-freiem ddH₂O unter Zentrifugation bei 20 800 x g für 1 min eluiert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.7 cDNA-Synthese

Der reversen Transkription von RNA in komplementäre cDNA wurde teilweise ein DNase-Verdau vorgeschaltet, um kontaminierende genomische DNA zu entfernen. Direkt im Anschluss erfolgte die reverse Transkription mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase). Als Startpunkt für die Reverse Transkriptase sind Primer notwendig, die sich an die RNA anlagern. Hierzu dienten Random Hexamer Oligonukleotide, die aus sechs zufällig zusammengesetzten Nukleotiden bestehen und an verschiedenen Stellen der RNA (auch Nicht-mRNA) binden.

3.7.1 cDNA-Synthese aus Zell-RNA

DNase-Verdau

Die aus JEG-3-Zellen gewonnene RNA wurde mit RNase-freier DNase I (1 U/µl, Fermentas) behandelt: 1 µg RNA bei stabil transfizierten JEG-3 Zellen und 5 µg bei nativen JEG-3-Zellen wurden mit RNase-freiem DEPC-ddH₂O auf 8 µl aufgefüllt und mit 1 µl 10 x Reaktionspuffer mit MgCl₂ sowie 1 µl DNase I bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die DNase wurde anschließend durch Zugabe von 1 µl EDTA (50 mM) und 10-minütiger Inkubation bei 65 °C inaktiviert. Dieser Ansatz wurde zur cDNA-Synthese verwendet. Die aus HEK293-Zellen isolierte RNA wurde keinem DNase-Verdau unterzogen, da die bei der sich anschließenden Real-Time qRT-PCR verwendeten Assays exonübergreifend waren und somit keine genomische DNA detektierten.

Reverse Transkription

Die Reverse Transkription von Zell-RNA erfolgte mit dem *SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* von Invitrogen. Bis zu 5 µg RNA wurden mit DEPC-ddH₂O auf 8 µl aufgefüllt und 1 µl Random Hexamer Primer (50 ng/µl) sowie 1 µl dNTP-Mix (10 mM) dazugegeben. Zum Denaturieren der RNA wurde der Ansatz bei 65 °C für 5 min inkubiert und für mindestens 1 min auf Eis gekühlt. Währenddessen wurde pro Reaktion ein cDNA-Synthese-Mix in folgender Reihenfolge zusammenpipettiert:

10x RT Puffer	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNaseOUT (40 U/µl)	1 µl
SuperScript III RT (200 U/µl)	1 µl

Diese cDNA-Synthese-Mischung wurde der RNA/Primer/dNTP-Mischung zugegeben und das Reaktionsgefäß 10 min bei 25 °C inkubiert, so dass die Primer hybridisieren konnten. Es folgte eine 50-minütige Inkubation bei 50 °C, während der die Reverse Transkriptase SuperScript III cDNA synthetisierte. Anschließend wurde das Enzym bei 85 °C für 5 min inaktiviert, der Ansatz auf Eis gekühlt und die cDNA bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt. Bei nativen JEG-3-Zellen und HEK293-Zellen wurde der Inaktivierung der Reversen Transkriptase noch ein RNaseH-Verdau (1 µl) nachgeschaltet (20 min bei 37 °C), um den *template*-RNA Strang zu verdauen. Die Beschreibung der Real-Time qRT-PCR erfolgt in Kapitel 3.9.3.

3.7.2 cDNA-Synthese aus LACP-RNA

DNase-Verdau

Die aus LACP-Proben extrahierte RNA wurde mit RNase-freier, rekombinanter DNase I (10 U/µl, Roche) verdaut. Um einen gleichzeitigen Verdau der empfindlichen mRNA zu verhindern, wurde dem Ansatz ein RNase Inhibitor (40 U/µl, Applied Biosystems) zugesetzt. 2 µl 10 x Inkubationspuffer, 1 µl DNase I und 0,25 µl RNase-Inhibitor wurden zu 6,65 µl RNA-Lösung gegeben und im *Thermocycler Primus 96 advanced gradient* (PeqLab) nach folgendem Temperaturprogramm inkubiert:

25 min bei 37 °C zum Arbeiten der DNase

10 min bei 75 °C zum Inaktivieren der DNase

Abkühlen auf 4 °C

Reverse Transkription

Als Reverse Transkriptase wurde das Enzym *MultiScribe Reverse Transcriptase* (Applied Biosystems) eingesetzt und für einen einfachen Ansatz folgender RT-Master-Mix vorbereitet:

MgCl ₂ (25 mM)	2,2 µl
10x PCR Gold Puffer	1,1 µl
dNTPs (10 mM)	4,4 µl
Random Hexamers (50 µM)	0,55 µl
RNase-Inhibitor (20 U/µl)	0,55 µl
MultiScribe RT (50 U/ µl)	0,55 µl

Zu 9,35 µl RT-Mix wurden 1,65 µl DNase-behandelte cDNA gegeben und nach folgendem Temperaturprogramm im *Thermocycler Primus 96 advanced gradient* inkubiert:

8 min bei 21 °C zum Anlagern der Primer

15 min bei 42 °C zum Umschreiben der RNA in cDNA durch die Reverse Transkriptase

5 min bei 99 °C zum Inaktivieren der Reversen Transkriptase

5 min bei 5 °C zum Abkühlen

Die cDNA wurde bis zur Weiterverarbeitung in der Reversen Transkriptase (RT)-PCR (Kapitel 3.9.2) bei -20 °C aufbewahrt.

3.8 Isolierung von DNA aus Zellen

Die Isolierung von DNA erfolgte aus JEG-3-Zellen, die stabil mit dem Vektor pFRT/*lacZeo* transfiziert waren (FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinien, Kapitel 3.12). Hierzu wurde TRI-Reagent (Sigma-Aldrich) nach Herstellerprotokoll verwendet, wobei sich die folgenden Mengenangaben auf 1 ml eingesetztes TRI-Reagent beziehen. Die Zellyse und Phasenseparierung erfolgte wie bereits bei der RNA-Isolierung in Kapitel 3.6.1 erläutert. Die obere RNA-enthaltende Phase wurde entfernt und mit der eigentlichen DNA-Isolierung begonnen. 300 µl 100%iges Ethanol wurden zugegeben und das Reaktionsgefäß zum Mischen mehrfach invertiert. Der Ansatz wurde 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert, 5 min bei 2200 x g (4500 rpm) und 4 °C zentrifugiert, um die DNA zu pelletieren, und der Überstand (mit Proteinen) abgezogen. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml 0,1 M Natriumcitrat/Ethanol-Lösung gewaschen, indem es für 30 min bei Raumtemperatur mit dieser Lösung inkubiert wurde sowie gelegentlich durch Umdrehen des Reaktionsgefäßes gemischt wurde. Schließlich wurde 5 min bei 2200 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgezogen. Dieser Waschschrift wurde wiederholt, das Pellet in 1,5-2 ml 75%igem Ethanol resuspendiert und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Es folgte eine 10-20-

minütige Inkubation bei Raumtemperatur, bei der die Proben gelegentlich durch Umdrehen gemischt wurden. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei $2200 \times g$ wurde der Überstand entfernt und das Pellet 20 min luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 8 mM NaOH bei 47°C im Wasserbad gelöst und unlösliches Material durch Zentrifugieren bei $11\,700 \times g$ ($10\,500 \text{ rpm}$) entfernt. Die DNA-Lösung wurde mit HEPES auf pH 7,5 eingestellt ($180 \mu\text{l}$ $0,1 \text{ M}$ HEPES pro 1 ml DNA-Lösung) und mit $0,1 \text{ M}$ Na_2EDTA versetzt, so dass die Endkonzentration 1 mM Na_2EDTA war. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C .

Die Isolierung von DNA aus FlpIn-HEK293-Zellen erfolgte mit dem *DNeasy Blood and Tissue Kit* von Qiagen nach Protokoll des Herstellers: 5×10^6 Zellen wurden herunterzentrifugiert, das Pellet in $200 \mu\text{l}$ PBS resuspendiert und mit $20 \mu\text{l}$ Proteinase K versetzt. Puffer AL wurde hinzugegeben und durch 10 s Pulsvortexen eine homogene Lösung erreicht, die 10 min bei 56°C im Wasserbad inkubiert wurde. Nach Zugabe von $200 \mu\text{l}$ 100%igem Ethanol und erneutem Pulsvortexen wurde die Lösung in *DNeasy Mini Spin Columns* (Zentrifugationssäulen) überführt und 1 min bei $5900 \times g$ (8000 rpm) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, $500 \mu\text{l}$ Puffer AW1 auf die Säule gegeben und 1 min bei $5900 \times g$ zentrifugiert. Nun wurden $500 \mu\text{l}$ Puffer AW2 hinzugefügt und 3 min bei $16\,200 \times g$ ($13\,200 \text{ rpm}$) zentrifugiert, um die DNA-bindende Membran der Zentrifugationssäule zu trocknen. Die Zentrifugationssäule wurde auf ein $1,5 \text{ ml}$ Reaktionsgefäß gesetzt und zur Elution der DNA $200 \mu\text{l}$ Puffer AE direkt auf die Membran pipettiert. Dieser Ansatz wurde 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 1 min bei $5900 \times g$ zentrifugiert, so dass die gelöste DNA ins Reaktionsgefäß gelangte. Dieser Schritt wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit $200 \mu\text{l}$ Puffer AE wiederholt, um die Ausbeute zu maximieren.

3.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur Vervielfältigung ausgewählter DNA-Abschnitte. Eine DNA-abhängige DNA-Polymerase synthetisiert mit Hilfe von spezifischen Primern und Nukleotiden (Desoxynukleosid-Triphosphate, dNTPs) entlang eines DNA-Einzelstranges einen komplementären DNA-Strang. Zunächst werden die beiden Doppelstränge der DNA bei hohen Temperaturen getrennt (Denaturierung), gefolgt von einer Temperatursenkung, bei der sich die Primer an den passenden DNA-Abschnitt der entstandenen Einzelstränge anlagern können (Primerhybridisierung). Die Temperatur wird anschließend auf das Temperaturoptimum der Polymerase erhöht, so dass diese von den Primern ausgehend entlang des DNA-Einzelstranges Nukleotide anlagert und einen komplementären Strang synthetisiert (Elongation). Nach jedem Zyklus verdoppelt sich die Anzahl an DNA-Doppelsträngen und ermöglicht eine exponentielle Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnittes.

3.9.1 PCR

Die in dieser Arbeit gezeigte PCR diente dem Nachweis des pFRT//lacZeo-Vektors, der stabil in JEG-3-Zellen transfiziert worden war (FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinien). Die DNA-Isolierung aus diesen Zellen wird in Kapitel 3.8 beschrieben. Für die PCR wurde das *FastStart High Fidelity PCR-System* (Roche Diagnostics) nach folgendem Protokoll eingesetzt:

ddH ₂ O	39,5 µl
10 x Fast Start High Fidelity Reaktionspuffer mit 18 mM MgCl ₂	5 µl
DMSO	1 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)	1 µl
DNA (0,025 µg/µl)	1 µl
FastStart High Fidelity Enzymmischung (5 U/µl)	0,5 µl
	<hr/> 50 µl

Primer	Sequenz 5' → 3'	T _m
LacZ-F	ATT ATC CGA ACC ATC CGC TGT GGT AC	64,8 °C
LacZ-R	GCA CCA TGC CGT GGG TTT CAA TAT TG	64,8 °C

Die Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) erworben.

Das Temperaturprogramm wurde nach folgendem Protokoll im *MJ Mini Personal Thermal Cycler* (Bio-Rad) ausgeführt:

Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	} 35 x
Primerhybridisierung	60 °C	30 s	
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	7 min	
Kühlung	4 °C	n. B.	

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte durch Elektrophorese in einem 1%igen Agarose-Gel.

3.9.2 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Bei der RT-PCR wird zunächst RNA in komplementäre cDNA umgeschrieben, die als Template in einer PCR-Reaktion eingesetzt wird. Diese Technik wurde für Proben verwendet, die durch *Laser-assisted cell picking* gewonnen wurden. Die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese dieser Proben sind in Kapitel 3.6.2 und 3.7.2 beschrieben. Die PCR wurde

mit der *AmpliTaq Gold DNA Polymerase* (Applied Biosystems) nach folgendem Protokoll durchgeführt.

ddH ₂ O	10,375 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
10x PCR Gold Puffer	2,5 µl
Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
cDNA	10 µl
AmpliTaq Gold DNA Polymerase (5 U/µl)	0,125 µl
	<hr/> 25 µl

Primer	Sequenz 5' → 3'	T _m
SOAT-F4	ACC TGG TCC TGG AGT CTT C	58,8 °C
SOAT-R4	GAA TGG TCA GGC ACA CAA G	56,7 °C
B-AktinH-F4	GCG AGA AGA TGA CCC AGA TC	60 °C
B-AktinH-R4	CGT ACA GGG ATA GCA CAG C	59 °C

Die SOAT-Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) und die β-Aktin-Primer von Metabion (Martinsried) erworben.

Da schon während der cDNA-Synthese genügend dNTPs eingesetzt wurden, brauchten diese bei der PCR nicht ergänzt werden. Als Negativkontrolle wurde cDNA durch ddH₂O ersetzt und 0,5 µl dNTPs hinzugefügt.

Die PCR lief nach folgendem Temperaturprogramm im *Thermocycler Primus 96 advanced gradient*:

Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	10 Zyklen
Primerhybridisierung	60 °C – 0,5 °C/Zyklus	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Denaturierung	95 °C	30 s	34 Zyklen
Primerhybridisierung	57 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Finale Elongation	72 °C	7 min	
Kühlung	4 °C	n. B.	

Zur Analyse wurden 20 µl PCR-Produkt mit 4 µl 6 x Ladepuffer vermischt und auf ein 3%iges Agarose-Gel aufgetragen.

3.9.3 Real-Time quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ermöglicht die Erfassung von PCR-Produkten im zeitlichen Verlauf der Reaktion (Echtzeit). Bei den hier benutzten TaqMan-Fluoreszenzsonden wird bei jedem gebildeten PCR-Produkt ein Fluoreszenzsignal ausgesendet, das auf die Menge eingesetzter DNA rückschließen lässt. Hierbei bindet neben den sequenzspezifischen PCR-Primern eine fluoreszenzmarkierte Sonde innerhalb des zu amplifizierenden Segments. An ihrem 5'-Ende sitzt der Fluoreszenzfarbstoff FAM und am 3'-Ende ein nicht fluoreszierender Quencher, der aufgrund seiner räumlichen Nähe zum Fluoreszenzfarbstoff eine Lichtemission unterdrückt. Die Taq-Polymerase amplifiziert, von Primern ausgehend, die DNA. An der Sonde angekommen, spaltet sie aufgrund ihrer 5'-3'-Exonuklease-Aktivität zunächst den Fluoreszenzfarbstoff ab, der nun nicht mehr durch den Quencher unterdrückt wird und nach Anregung ein Fluoreszenzsignal definierter Wellenlänge aussendet. Die während der Synthese gemessene Fluoreszenzintensität ist proportional zur Anzahl neu gebildeter PCR-Produkte und lässt auf die Menge an Ausgangs-DNA rückschließen. Auch der Rest der Sonde sowie der Quencher werden nun abgespalten und der DNA-Strang weiter verdoppelt. Am 3'-Ende sitzt neben dem Quencher ein *minor groove binder* (MGB), der die gebundene Sonde am DNA-Strang stabilisiert, so dass kürzere Sondensequenzen benutzt werden können (Abb. 3.1).

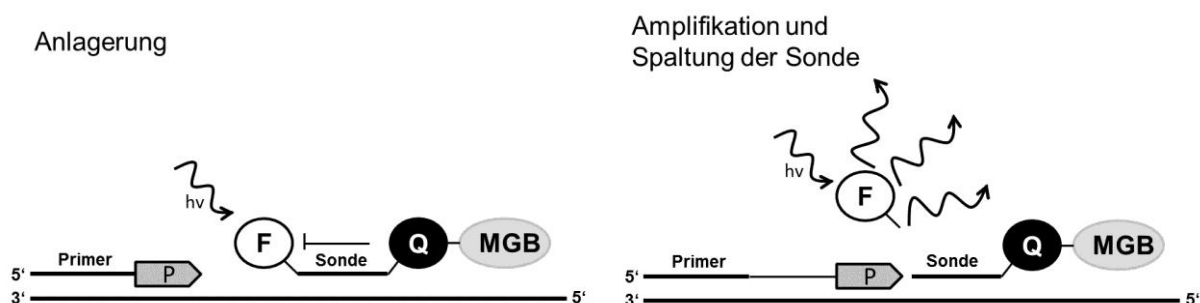


Abb. 3.1: Prinzip der Real-Time qRT-PCR mit TaqMan-Sonden

Nach der Denaturierung des Doppelstrangs lagern sich die Primer und die Sonde an den DNA-Einzelstrang an. Die Fluoreszenz des Farbstoffs FAM (F) wird durch den Quencher (Q) unterdrückt. Die Polymerase (P) verlängert den Strang in 5'-3'-Richtung und spaltet schließlich den Fluoreszenzfarbstoff ab, der nun Licht emittiert. Die restliche Sonde wird vollständig abgespalten und der DNA-Strang weiter amplifiziert.

In dieser Arbeit wurde die Real-Time qRT-PCR zur Erstellung eines Expressionsprofils von nativen JEG-3-Zellen über verschiedene Transporter und Enzyme verwandt. Außerdem erfolgte die Überprüfung der Genexpression in den selbst generierten, stabil transfizierten SOAT-, OATP2B1- und OAT4-JEG-3-Zellen. Des Weiteren erfolgte die Überprüfung der Genexpression in den benutzten SOAT-, OAT4-, OATP2B1-, NTCP-, ASBT- sowie FlpIn-HEK293-Zellen. Hierzu wurde zunächst RNA aus Zellen isoliert (Kapitel 3.6.1), in cDNA

umgeschrieben (Kapitel 3.7.1) und schließlich als Template für die PCR eingesetzt (Two-Step RT-PCR). Ein Reaktionsansatz beinhaltete:

TaqMan Gene Expression Master Mix	12,5 µl
ddH ₂ O	6,25 µl
TaqMan Gene Expression Assay	1,25 µl
cDNA	5 µl

Der *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems) enthält die *AmpliTaq Gold DNA Polymerase, UP (Ultra Pure)* für *Hot Start PCR*, die erst bei erhöhter Temperatur aktiviert wird, wenn DNA denaturiert vorliegt. Außerdem sind Puffer-Komponenten, dNTPs und der Kontrollfarbstoff ROX enthalten. Dieser stellt eine interne Referenz dar, zu der der Sondenfluoreszenzfarbstoff normalisiert werden kann und Unterschiede bezüglich Konzentration oder Volumen ausgeglichen werden können. Der *TaqMan Gene Expression Assay* (Applied Biosystems) enthält sequenzspezifische Primer und die fluoreszenzmarkierte Sonde.

Zunächst wurden die Komponenten außer der cDNA in einem sterilen, mit UV-Licht behandelbaren Abteil auf Eis in eine 96-Well-Platte (Applied Biosystems) pipettiert. Die cDNA wurde außerhalb dieses Abteils hinzugefügt. Die Platte wurde mit Folie zugeklebt, zentrifugiert und die PCR-Reaktion im Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	} 45 Zyklen
Denaturierung	95 °C	15 s	
Primerhybridisierung	60 °C	1 min	
Kühlung	4 °C	n. B.	

Die Auswertung erfolgte durch eine relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Der C_T -Wert (*signal threshold cycle*) bezeichnet den Zyklus, bei dem ein signifikant erhöhtes Fluoreszenzsignal im Vergleich zum unspezifischen Hintergrund messbar ist. Zunächst wurde der C_T -Wert des Referenzgens β -Aktin vom C_T -Wert des zu untersuchenden Gens abgezogen ($=\Delta C_T$). Im zweiten Schritt wurde der ΔC_T -Wert des am niedrigsten exprimierten Gens (Kalibrator) von den anderen ΔC_T -Werten abgezogen ($=\Delta\Delta C_T$). Abschließend erfolgte eine Transformation nach der Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Der erhaltene Wert gibt die x-fache Expression des Gens im Vergleich zum Kalibrator an.

3.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese. Je nach Größe der zu erwartenden DNA-Fragmente wurden 1-3%ige Agarosegele verwendet. Während 1%ige Gele eine gute Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 500-1000 bp ermöglichen, dienen 3%ige Gele dem Auftrennen von DNA-Fragmenten <100 bp, wie sie bei Proben aus dem *Laser-assisted cell picking* zu erwarten waren. Die Agarose wurde in 1 x TAE suspendiert, durch vorsichtiges Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und nach leichtem Abkühlen in einen Gelschlitten gegossen, der mit einer Taschenschablone versehen war. Nach Erstarren des Gels wurde es in eine mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt, die Taschenschablone entfernt und die mit 6 x *Loading Dye* (Ladepuffer, Thermo Scientific) vermischten Proben in die Taschen pipettiert (2 µl 6 x Ladepuffer auf 10 µl Probe). Zur Größenbestimmung diente standardmäßig der Längenstandard *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Scientific) bzw. für 3%ige Gele der *Low Molecular Weight Ladder* (NEB). Die Elektrophorese erfolgte bei 5-10 V/cm, bis die Bromphenolblaufront 2/3 des Gels durchlaufen hatte. Anschließend wurden die Gele 30 min in *GelRED*-Färbelösung (Biotium) gefärbt und mit dem *Image Master* (Amersham Pharmacia Biotech) fotografiert.

3.11 Zellbiologische Methoden

3.11.1 Kultivierung und Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ in Brutschränken kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurde das Medium gewechselt, um die Zellen mit neuen Nährstoffen zu versorgen und das im Medium enthaltene L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin zu erneuern, die nur wenige Tage bei 37 °C stabil sind. Nach Erreichen von ca. 90 % Konfluenz wurden die Zellen abgelöst und die Zellzahl in der Schale verringert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen ein- bis zweimal mit PBS gewaschen und Trypsin-EDTA-Lösung (1 ml bei 75 cm²-Flaschen, 2 ml bei 175 cm²-Flaschen) auf die Zellen gegeben. Da Trypsin seine größte Aktivität bei 37 °C entfaltet, wurden die Schalen 1-4 min in den Brutschrank gestellt, so dass sich die Zell-Zell-Verbände sowie die Verbindung zum Flaschenboden lösten. Durch Klopfen an der Flaschenwand wurden alle Zellen vollständig abgelöst, die Trypsinwirkung durch Zugabe der doppelten Menge Medium gestoppt und die Zellen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Hemmung des Trypsins erfolgt zum einen durch im fetalen Kälberserum enthaltene Trypsininhibitoren, die Trypsinwirkung wird aber zusätzlich durch einen Verdünnungseffekt über das hinzugegebene Medium gemindert. Je nach Bedarf wurde ein Teil der Zellsuspension auf zusätzliche Zellkulturflaschen verteilt, eingefroren oder für Versuche ausgesät. Im Gegensatz

zu HEK293-Zellen, die in der Regel einen gleichmäßigen Zellrasen in der Zellkulturflasche bilden, zeigen JEG-3-Zellen koloniales Wachstum und setzen sich nach dem Ablösen in Gruppen ab, die Startpunkte für neue Kolonien bilden. Bei geringer Zellzahl und damit einer geringen Dichte an Kolonien (beispielsweise während der stabilen Transfektion) war es daher nötig, auch vor Erreichen vollständiger Konfluenz die Zellen abzulösen. Auf diese Weise wurden neue Startpunkte für Kolonien gesetzt und verhindert, dass Zellen zu lange im Inneren einer Kolonie verblieben, was zum Absterben der Zelle führen kann.

3.11.2 Auszählen und Aussäen von Zellen

Das Aussäen von Zellen erfolgte in 12- oder 24-Well-Platten, deren Wells zur Verbesserung der Zelladhärenz ca. 30 min mit Poly-L-Lysin inkubiert wurden. Um eine definierte Zellzahl in jedes Well zu überführen, wurde nach dem Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche zunächst die Anzahl der Zellen in der Zellsuspension bestimmt. Hierzu wurden 50 µl Zellsuspension in 400 µl PBS verdünnt, mit 50 µl Trypanblau zur Lebend-Tod-Färbung versetzt und in einer Bürker-Zählkammer ausgezählt. Die benötigte Menge Zellsuspension wurde berechnet, das Volumen entsprechend mit Medium verdünnt und 1 ml Zellsuspension pro Well bei 24-Well-Platten, bzw. 2 ml bei 12-Well-Platten eingesetzt. Hierbei ist bei JEG-3-Zellen zu beachten, dass sich diese vermehrt in der Mitte der Wells absetzen, während die Randbereiche zellarm bleiben. Um ein gleichmäßiges Absetzen zu gewährleisten und die Zellwolke in der Mitte der Wells aufzulösen, war hier ein mehrfaches ruckartiges Hin- und Herbewegen der Platten von besonderer Bedeutung.

3.11.3 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese zunächst wie oben beschrieben vom Zellflaschenboden gelöst und 1350 µl Zellsuspension in Kryovials gegeben, in die 150 µl DMSO vorgelegt waren. Der Anteil an DMSO am Gesamtvolumen betrug damit 10 %. Es erfolgte ein stufenweises Einfrieren, bei dem die Kryovials zunächst in Styroporboxen ca. 2 h bei -20 °C und über Nacht bei -80 °C gelagert wurden, bevor sie in flüssigen Stickstoff zur Langzeitlagerung überführt wurden.

3.11.4 Auftauen von Zellen

Aufgrund der bei Raumtemperatur zelltoxischen Wirkung des Gefrierschutzmittels DMSO sollte das Auftauen rasch geschehen. Die Kryovials wurden mit Hilfe eines Schwimmers bei 37 °C im Rüttelwasserbad ca. 2 min erwärmt, bis die Eiskristalle gelöst waren und die aufgetaute Zellsuspension unter der Sterilbank in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt werden konnte. Zum Entfernen des Einfriermediums wurde die Suspension 5 min bei 700 x g (3000 rpm) zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Medium

resuspendiert. Nach Überführen in eine Zellkulturflasche erfolgte die Kultivierung wie oben beschrieben.

3.11.5 Herstellung von DCC-FKS

Um im fetalen Kälberserum (FKS) enthaltene Steroidhormone zu entfernen, wurde das FKS für die Metabolismusmessungen mit Aktivkohle behandelt. 0,5 g *Dextran Coated Charcoal* (DCC, Aktivkohle) wurden zu 100 ml FKS gegeben, geschüttelt und 24 h bei 4 °C aufbewahrt. Der Anteil an Aktivkohle betrug somit 0,5 %. Die Aktivkohle setzte sich ab und das FKS wurde dekantiert. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt, wobei jeweils ein Anteil von 0,5 % Aktivkohle zugesetzt wurde. Danach wurde das FKS über einen Faltenfilter filtriert, anschließend sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße) und das erhaltene DCC-FKS bei -20 °C gelagert.

3.12 Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen

Zur Untersuchung von Proteinen im Zellmodell muss zunächst die DNA des zu untersuchenden Gens in die Zelle eingeführt werden. Diese wird zunächst in einen Vektor integriert und mit Hilfe eines Transfektionsmediums in die Zelle eingebracht, wo sie in ein Protein translatiert werden kann. Die aufgenommene DNA wird nach wenigen Tagen in der Zelle abgebaut; somit handelt es sich um eine transiente Transfektion. Selten wird das Konstrukt dauerhaft in das Genom der Zelle eingebaut, wo es vor Abbau geschützt ist und an die Tochterzellen weitergegeben wird. Ist der Vektor mit einem Resistenzgen gegenüber einem bestimmten Antibiotikum ausgerüstet, können die Zellen selektioniert werden, die die eingebrachte DNA ins Genom aufgenommen haben, d. h. es liegt eine stabile Transfektion vor. Diese stabilen Zelllinien eignen sich besonders für die längerfristige Untersuchung von Proteinen. In dieser Arbeit wurden JEG-3-Zellen unter Verwendung des Flp-In-Systems von Invitrogen stabil mit den Steroidsulfattransportern SOAT, OATP2B1 und OAT4 transfiziert. Das Flp-In-System basiert auf folgendem Prinzip: In einem ersten Schritt wird der Vektor pFRT//lacZeo mit seiner *FRT site* (*Flp-In recombinant target site*) stabil in das Genom integriert, so dass eine FlpIn-Wirtszelllinie entsteht. In einem zweiten Schritt wird das zu untersuchende Gen (in dieser Arbeit verschiedene Transporter) in einem kompatiblen Plasmid, das ebenfalls eine *FRT site* enthält, an diese Stelle eingefügt. Die zu untersuchenden Gene werden daher jeweils an der gleichen Stelle im Genom eingebaut, so dass vergleichbare Zelllinien mit ähnlicher Expression der jeweiligen Gene entstehen.

3.12.1 Generierung einer FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinie

Der pFRT//lacZeo-Vektor enthält das Zeocin-Resistenzgen, das die Selektion von Zellen ermöglicht, die den Vektor stabil integriert haben. Hierzu war es nötig, die minimale Zeocin-Konzentration zu ermitteln, die untransfizierte JEG-3-Zellen innerhalb von 1-2 Wochen tötet. Zellen wurden in 12-Well-Platten ausgesät, so dass sie am nächsten Tag 25 % Konfluenz hatten und Zeocin-Konzentrationen zwischen 5 und 100 µg/ml getestet. Dabei erwiesen sich 10 µg/ml als ausreichend, die nachfolgend zur Selektion eingesetzt wurden. Vorbereitend zur stabilen Transfektion wurde der pFRT//lacZeo-Vektor mit dem Restriktionsenzym Scal linearisiert, durch Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und mittels Ethanolfällung konzentriert. In eine 6-Well-Platte wurden 1,1 Mio JEG-3-Zellen pro Well ausgesät, so dass sie am folgenden Tag eine Konfluenz von ca. 80-90 % hatten. Die Transfektion erfolgte mit dem Lipid-basierten Transfektionsmedium *Fugene HD* (Promega) nach folgendem Protokoll: Das Transfektionsmedium *Fugene HD* und die DNA wurden auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig gemischt. Pro Well wurden 1,2 µg pFRT//lacZeo-Vektor und 3,6 µl Transfektionsmedium eingesetzt sowie Opti-MEM in einem Volumen vorgelegt, das auf 150 µl ergänzte. Der Transfektions-Mix wurde 15 min inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 3 ml Ham's F12 Medium pro Well vorgelegt. 150 µl Transfektions-Mix wurden in die Wells getropft und die Platte 10-30 s gerüttelt. 24 h später wurden die Zellen gewaschen, um das Transfektionsmedium zu entfernen und gegen frisches Medium auszutauschen. Weitere 24 h später wurden die Zellen mit 500 µl Trypsin-EDTA abgelöst und die Reaktion mit 1,5 ml Medium gestoppt. Jeweils 1 ml Zellsuspension wurden in zwei Petrischalen gegeben und mit 9 ml Medium aufgefüllt. Am nächsten Tag wurde das Medium abgezogen und Selektionsmedium mit 10 µg/ml Zeocin hinzugefügt. Nachdem sich einzelne resistente Kolonien gebildet hatten, wurden diese einzeln in Wells einer 24-Well-Platte umgesetzt und schließlich in einer 12,5 cm²-Schale weiterkultiviert. Um den geeignetsten Klon dieser FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinien für die weitere Transfektion auszuwählen, wurde die Stärke der Expression des LacZ-Gens anhand des β-Galactosidase-Assays überprüft.

3.12.2 β-Galactosidase-Assay

Das pFRT//lacZeo-Plasmid wurde an einer zufälligen Stelle im Genom der JEG-3-Zellen eingebaut und FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinien generiert. Über die *FRT site* des Plasmids sollte in einem nächsten Schritt der gewünschte Transporter durch eine zweite stabile Transfektion eingefügt werden (Abb. 3.2). Um eine hohe Expression des Transporters zu gewährleisten, ist es von Interesse, das das pFRT//lacZeo-Plasmid an einer transkriptionell aktiven Stelle des Genoms eingebaut wird, da diese die spätere Lokalisation des Transporters darstellt.

Das im Plasmid enthaltene LacZ-Gen exprimiert das Enzym β -Galactosidase, so dass über die Menge synthetisierter β -Galactosidase Rückschluss auf die transkriptionelle Aktivität dieser Stelle des Genoms gezogen werden kann. Um die Qualität verschiedener FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinien zu vergleichen und die Auswahl eines geeigneten Klons zu ermöglichen, wurde der β -Galactosidase-Assay durchgeführt. Das Prinzip beruht auf einer Spaltung des farblosen o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosids (ONPG) durch die β -Galactosidase in Galactose und den gelben Farbstoff o-Nitrophenol (ONP), der bei einer Wellenlänge um 420 nm gemessen werden kann.

Hierzu wurden die im Protokoll des β -Gal Assay Kits (Invitrogen) genannten Lösungen und Puffer selbst hergestellt und nach diesem Protokoll vorgegangen: Klone verschiedener FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinien, untransfizierte JEG-3-Zellen als Negativkontrolle und FlpIn-HEK293-Zellen als Positivkontrolle wurden mit Trypsin-EDTA abgelöst. Je nach Zelldichte wurden 750-1500 μ l Zellsuspension herunterzentrifugiert, in 130 μ l Tris-Lysepuffer resuspendiert und bei 4 °C aufbewahrt, bis alle Zellklone bereitgestellt waren. Es folgten vier Frier-Tau-Zyklen bei -80 °C und bei 37 °C im Wasserbad. Unlösliches Material wurde 5 min bei 20 800 x g (14 000 rpm) und 4 °C herunterzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser wurde bei -80 °C über Nacht aufbewahrt. Von jedem Zelllysats wurden 5, 10, und 30 μ l in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit ddH₂O auf 30 μ l aufgefüllt. 70 μ l ONPG (4 mg/ml) und 200 μ l 1 x Cleavage-Puffer mit β -Mercaptoethanol wurden hinzugefügt, vorsichtig gemischt und kurz herunterzentrifugiert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C im Wasserbad, während der die β -Galactosidase das Substrat ONPG spalten konnte und sich der gelbe Farbstoff ONP bildete. Um die Aktivität zu stoppen, wurden 500 μ l Stopp-Puffer hinzugefügt und die Absorption bei 415 nm gemessen. Hierzu wurden pro Probe 3 x 200 μ l in eine 96-Well-Platte pipettiert und im *Microplate Reader* gemessen. Als Leerwert diente Cleavage-Puffer mit ONPG ohne Zelllysats. Um unterschiedliche Proteinkonzentrationen zu berücksichtigen, wurde mit dem Ausgangszelllysats eine Proteinbestimmung mit dem BCA-Assay (Novagen) durchgeführt. Die Berechnung der spezifischen Aktivität der β -Galactosidase erfolgte anhand folgender Formeln:

$$\text{nmol hydrolysiertes ONPG} = \frac{(\text{OD}_{415}) \times 8 \times 10^5 \text{ nl}}{4500 \frac{\text{nl}}{\text{nmol} \times \text{cm}} \times 1 \text{ cm}}$$

Spezifische Aktivität = nmol hydrolysiertes ONPG/Zeit/mg Protein

Ein Vergleich der spezifischen β -Galactosidase-Aktivität verschiedener FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinien ermöglichte die Auswahl geeigneter Klone für die stabile Transfektion mit verschiedenen Transportern. Der für die weiteren Versuche eingesetzte Klon wurde auf den Namen JEG-3-FRT getauft.

3.12.3 Generierung von stabil mit Transportern transfizierten JEG-3-Zellen

Die Transporter SOAT, OATP2B1 und OAT4 wurden stabil in JEG-3-FRT-Zellen transfiziert. Die genutzten fertigen Expressionsvektoren SOAT-pcDNA9/FRT/TO, OATP2B1-pcDNA9/FRT/TO und OAT4-pcDNA5/FRT wurden von Dr. B. Ugele (München) zur Verfügung gestellt. Sie enthalten ein Hygromycin B-Resistenzgen, das die Selektion von transfizierten Zellen ermöglichte. Hierzu wurde zunächst ein Hygromycin-Sensitivitätstest an untransfizierten Zellen durchgeführt und Konzentrationen zwischen 2,5 und 400 µg/ml getestet. Der Bereich von 10-40 µg/ml erwies sich als ausreichend zytotoxisch für untransfizierte Zellen. Für die Transfektion wurden pro Well 4×10^5 Zellen der generierten FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinien (JEG-3-FRT) in 12-Well-Platten ausgesät und am nächsten Tag einzeln mit den oben genannten Expressionsvektoren sowie dem pOG44-Vektor cotransfiziert. Der pOG44-Vektor exprimiert die Flp-Rekombinase, die durch Rekombination der *FRT sites* den Expressionsvektor in das Genom des pFRT/*lacZeo*-Vektors einfügt (Abb. 3.2).

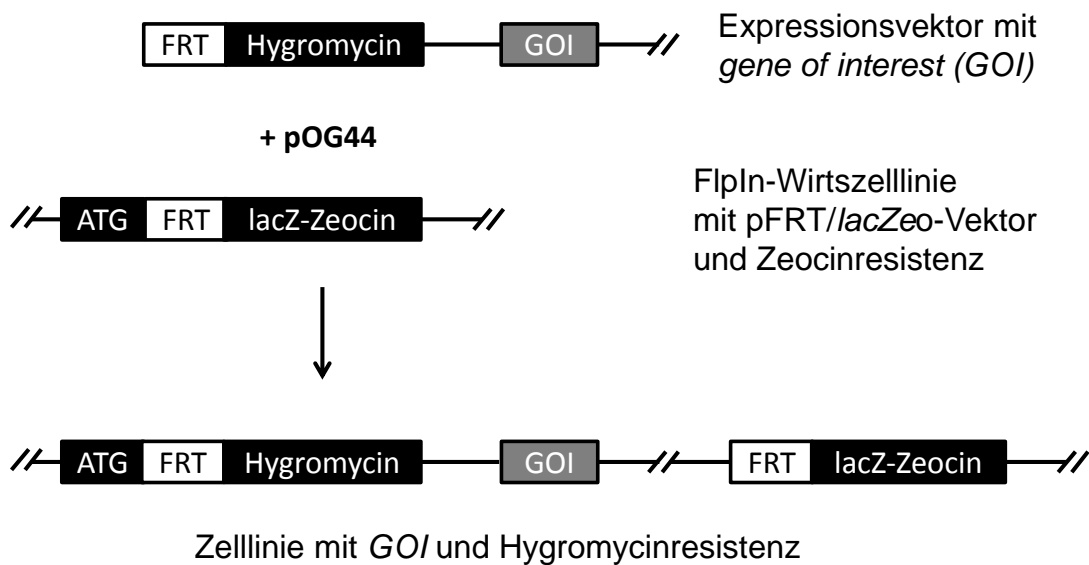


Abb. 3.2: Vereinfachte Darstellung des Flp-In-Systems von Invitrogen

Die FlpIn-Wirtszelllinie enthält den pFRT/*lacZeo*-Vektor, der eine *FRT site* enthält und eine Zeocinresistenz vermittelt. Die Expressionsvektoren pcDNA5/FRT oder pcDNA9/FRT/TO mit dem *gene of interest* (GOI), in dieser Arbeit SOAT, OATP2B1 oder OAT4, wurden zusammen mit dem pOG44-Vektor in die FlpIn-Wirtszelllinie cotransfiziert. pOG44 codiert eine Flp-Rekombinase, die den Expressionsvektor über die *FRT sites* in die FlpIn-Wirtszelllinie einfügt. Das Hygromycin-Resistenzgen des Expressionsvektors befindet sich daraufhin benachbart zum ATG-Start-Codon und SV40-Promotor (nicht dargestellt) des pFRT/*lacZeo*-Vektors. Es wird daher exprimiert, während die Zeocinresistenz verloren geht (Life Technologies - Handbuch Flp-In System 2013).

Pro Well wurden 0,25 µg Expressionsvektor-DNA, 1,75 µg pOG44 und 6 µl *Fugene HD* Transfektionsmedium eingesetzt sowie mit Opti-MEM auf 50 µl aufgefüllt. In die Wells wurde 1 ml Ham's F12 vorgelegt, 50 µl Transfektions-Mix pro Well dazugetropft und 24 h inkubiert.

Das Medium wurde gewechselt und am darauffolgenden Tag jeweils ein Well in eine Petrischale umgesetzt. Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie bei der Generierung der FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinie beschrieben. Für die Selektion wurden 10 µg/ml Hygromycin eingesetzt, die Konzentration wurde später bei SOAT und OATP2B1-JEG-3-Zelllinien auf 40 µg/ml erhöht. Die für die Versuche eingesetzten Zellklone wurden SOAT-JEG-3 #1 und #2 benannt, bei denen es sich um zwei unterschiedliche Klone handelt. Bei OATP2B1 und OAT4 wurde der verwendete Zellklon OATP2B1-JEG-3 bzw. OAT4-JEG-3 genannt.

3.13 Transportmessungen mittels Flüssigszintillationsmessung

Transportmessungen wurden an nativen und stabil mit Transportern transfizierten JEG-3-Zellen sowie an stabil mit Transportern transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Gemessen wurde die Aufnahme der Substanzen DHEAS und E₁S.

3.13.1 Versuchsvorbereitung

Die Zellen wurden drei Tage vor der Messung in 24-Well- oder 12-Well-Platten ausgesät, so dass sie am Tag der Messung etwa 90–100 % Konfluenz aufwiesen. Zellen, die für eine Proteinexpression auf Tetrazyklin angewiesen waren, wurden zusätzlich 72 h vor der Messung mit Tetrazyklin (1 µg/ml) induziert.

Die Messlösung für Radioaktivmessungen bestand aus nicht-radioaktiv markierter Substanz, die in Transportpuffer gelöst war und der zu einem geringen Prozentsatz Tritium-markierte [³H]-Substanz zugesetzt wurde. Hierzu wurde das Ethanol, in dem die radioaktiv markierte Substanz gelöst war, zunächst unter dem Isotopenabzug bei geöffnetem Reaktionsgefäß abgedampft und die Substanz in 37 °C warmem Transportpuffer gelöst. Wurde nur ein geringes Volumen an radioaktiv markierter Substanz eingesetzt, wurde auf das Verdampfen des Ethanols verzichtet. Zusätzlich wurde unmarkierte Substanz in DMSO gelöst und der radioaktiv markierten Substanz zugesetzt, so dass eine konzentrierte Stammlösung entstand. Diese wurde dann in natriumhaltigem oder natriumfreiem Transportpuffer verdünnt, so dass die gewünschte Endkonzentration mit definiertem Anteil radioaktiv markierter Substanz entstand. Für ein zeitgenaues Pipettieren und Abstoppen der Wells wurden die Platten mit einem heißen Draht in einzelne Reihen oder Wells geschnitten.

3.13.2 Aufnahmemessung

Transportmessungen fanden unter Anwesenheit von Natrium oder unter natriumfreien Bedingungen statt. Vor Beginn der Transportmessung wurde das Medium aus den Wells abgekippt und die Zellen dreimal mit 37 °C warmem PBS (für Messungen mit Natrium) bzw. mit natriumfreiem Transportpuffer (für Messungen ohne Natrium) gewaschen. Anschließend

wurden die Zellen 10 min mit Transportpuffer (natriumhaltig oder -frei) auf einer Wärmeplatte bei 37 °C equilibriert. Zum Starten der Aufnahmemessung wurde der Transportpuffer abgezogen und 300 µl (24-Well-Platte) oder 500 µl (12-Well-Platte) Messlösung zugegeben. Nach der erwünschten Zeit wurde die Messlösung abgekippt und die Substrataufnahme durch fünfmaliges Eintauchen der Wells in eiskaltes PBS gestoppt.

3.13.3 IC₅₀-Messungen

Zur Bestimmung der Konzentration an 16α-OH-DHEAS, die die Aufnahme von [³H]DHEAS in OAT4-, SOAT- und NTCP-HEK293-Zellen halbierte, wurden Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen an 16α-OH-DHEAS angesetzt, die zwischen 200 nM und 1500 µM lagen. Zusätzlich wurde eine Lösung ohne 16α-OH-DHEAS aus reinem Transportpuffer vorbereitet. Hierbei wurde berücksichtigt, dass in allen Lösungen die gleiche Menge DMSO (2 %) vorhanden war, welches das Lösungsmittel von 16α-OH-DHEAS darstellte. Die Messung startete wie bereits beschrieben mit dem Waschen der Zellen und Equilibrieren in Transportpuffer. Anschließend wurden 280 µl 16α-OH-DHEAS-Lösung zugegeben und die Zellen 5 min damit inkubiert. Darauf folgte die Zugabe von 20 µl [³H]DHEAS-Messlösung, die nach dem oben genannten Prinzip angesetzt wurde, so dass in den Wells eine Endkonzentration von 200 nM DHEAS vorlag. Nach weiteren 5 min wurde die Messung in eiskaltem PBS gestoppt.

3.13.4 Flüssigszintillationsmessung

Die von den Zellen aufgenommene Substratmenge wurde mittels Flüssigszintillationsmessung bestimmt. Hierzu wurden die Zellen durch Inkubation mit NaOH-SDS-Lysepuffer über Nacht bei 37 °C lysiert (400 µl bei 24-Well, 500 µl bei 12-Well) und ein Aliquot des Zelllysats in Minivials überführt. Nach Zugabe von 3 ml Szintillationsflüssigkeit und Vortexen wurde die enthaltene Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler bestimmt.

3.13.5 Proteinbestimmung nach Lowry

Um Unterschiede der Zelldichte zwischen verschiedenen Wells zu berücksichtigen, wurde der Proteingehalt in jedem Well mittels der Proteinbestimmung nach Lowry ermittelt. Hierzu wurde eine BSA-Standardreihe mit einer Proteinkonzentration von 0–800 µg/ml erstellt und 3 x 20 µl Standard bzw. Zelllysats aus jedem Well in eine 96-Well-Platte überführt. Anschließend wurden 200 µl Lösung C und nach 15-minütiger Inkubation 40 µl Folin-Lösung ergänzt. Nach zweistündiger Inkubation war die Farbreaktion abgeschlossen und die Extinktion wurde bei 655 nm im *Microplate Reader* bestimmt. Die Extinktionen der

Standardreihe ergaben in einer linearen Regression eine Eichgerade, die zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben diente.

3.13.6 Auswertung der Transportmessungen

Die aufgenommene Menge an radioaktiv markierter Substanz wurde anhand der im Flüssigszintillationszähler gemessenen Radioaktivität und der substanzspezifischen Umrechnungsfaktoren bestimmt. Anhand des bekannten prozentualen Anteils radioaktiv markierter Substanz in der Messlösung wurde die Gesamtmenge an aufgenommener Substanz berechnet, die in Bezug zur ermittelten Proteinkonzentration gesetzt wurde. Die Angabe der aufgenommenen Substanzmenge erfolgte in pmol/mg Protein. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse und Berechnung der IC_{50} -Werte wurde das Programm *GraphPad Prism 4.03* verwendet.

Für IC_{50} -Messungen wurde die Aufnahme von DHEAS in FlpIn-HEK293-Kontrollzellen von der Aufnahme in den stabil mit Transportern transfizierten Zellen abgezogen. Die sich daraus ergebende Aufnahmeleistung ohne Anwesenheit von 16 α -OH-DHEAS wurde auf 100 % gesetzt und die Aufnahmeleistung nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen an 16 α -OH-DHEAS dazu in Bezug gesetzt, so dass sich mit steigender Konzentration an 16 α -OH-DHEAS eine sinkende prozentuale Aufnahme von DHEAS ergab.

Die Berechnung von Signifikanzen wurde mit dem ungepaarten zweiseitigen t-Test durchgeführt und erfolgte ebenfalls mit dem Programm *GraphPad Prism 4.03*.

3.14 Transportmessungen mittels Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS-MS)

Transportmessungen mittels Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS-MS, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry) erfolgten ähnlich den Transportmessungen mit Flüssigszintillationszähler. Da die Substanzen direkt gemessen werden können, war hierfür jedoch keine Zugabe radioaktiv markierter Substanz notwendig.

3.14.1 Versuchsvorbereitung

Stabil transfizierte HEK293-Zellen wurden drei Tage vor der Messung in 12-Well-Platten ausgesät und falls nötig die Proteinexpression mit Tetrazyklin induziert. Die Messungen wurden wie die Radioaktivmessungen in natriumhaltigem oder natriumfreiem Transportpuffer durchgeführt. 16 α -OH-DHEAS wurde in DMSO vorgelöst und auf die Transportpuffer aufgeteilt. Für Affinitätsmessungen (Michaelis-Menten-Kinetiken) wurden verschiedene Konzentrationen an 16 α -OH-DHEAS vorbereitet, die je nach Zelllinie zwischen 1 μ M und 1000 μ M lagen.

3.14.2 Aufnahmemessung

Die Aufnahmemessung erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie bereits unter Kapitel 3.13.2 erläutert. Zum Start der Messung wurden 500 µl Messlösung in die Wells pipettiert. Für Hemmstudien wurden die Zellen für 5 Minuten mit 470 µl 1 mM BSP vorinkubiert und anschließend 30 µl 16α-OH-DHEAS zugegeben, so dass die Endkonzentration in den Wells 10 µM betrug.

3.14.3 LC-MS-MS-Messung

Zur Zelllyse wurde das Frier-Tau-Verfahren angewandt. Hierzu wurden 500–600 µl ddH₂O in die Wells pipettiert und 4 x bei -80°C gefroren und bei 37 °C aufgetaut. Ein Aliquot des Zelllysats wurde zur Bestimmung des 16α-OH-DHEAS-Gehaltes mittels LC-MS-MS entnommen. Diese wurde von A. Sánchez Guijo im Steroidlabor der Abteilung für allgemeine Pädiatrie und Neonatologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg (UKGM), Leitung Prof. S. Wudy, durchgeführt (Methode siehe Galuska et al. 2013). Als interner Standard für die Quantifizierung von 16α-OH-DHEAS diente Deuterium-markiertes Natrium-Estradiolsulfat (d4E₂S).

3.14.4 Proteinbestimmung mit dem BCA-Assay

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BCA-Assay Kit (Novagen). 3 x 25 µl BSA-Standard (0–1000 µg/ml) sowie Zelllysate wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert und 200 µl BCA-CuSO₄-Lösung ergänzt. Die Platte wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und die Extinktion bei 570 nm im *Microplate Reader* oder bei 560 nm im *GloMax-Multi+ Detection System* bestimmt. Die Extinktionen der Standardreihe ergaben in einer linearen Regression eine Eichgerade, die zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben diente.

3.14.5 Auswertung der Transportmessungen

Die im Zelllysate bestimmte Menge an 16α-OH-DHEAS wurde in Bezug zur Proteinmenge gesetzt, so dass die Aufnahme in pmol/mg Protein berechnet werden konnte. Die graphische Darstellung sowie die Berechnung der Michaelis-Menten-Kinetiken erfolgten mit dem Programm *GraphPad Prism 4.03*.

3.15 Metabolismusmessungen

JEG-3-Zellen besitzen aufgrund ihrer Abstammung von einem Chorionkarzinom Enzyme zur Synthese von Östrogenen aus Östrogenvorstufen. Native JEG-3-Zellen und die stabil transfizierten SOAT-, OATP2B1-JEG-3- sowie JEG-3-FRT-Zellen wurden in Polylysin-beschichtete 12-Well-Platten ausgesät und mit Medium versetzt, das DCC-FKS anstelle des normalen FKS enthielt. Dem DCC-FKS wurden durch Behandlung mit Aktivkohle (*Dextran Coated Charcoal*, DCC) vorhandene Steroidhormone entzogen, so dass die Zellen zum Zeitpunkt der Messung frei von extern zugefügten Östrogenen waren (Kapitel 3.11.5). Die Zellen wurden 72 h bis zu einer Konfluenz von ca. 95 % kultiviert. DHEAS, 16 α -OH-DHEAS und E₁S wurden in DMSO vorgelöst und in Ham's F12 Medium auf 5 μ M verdünnt, wobei der Anteil an DMSO in der Messlösung unter 0,01 % betrug. DHEA wurde nicht in DMSO, sondern in Ethanol vorgelöst. Die Zellen wurden 3 x mit PBS gewaschen, 1 ml der Messlösung in die Wells gegeben und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium in Reaktionsgefäße überführt und der Gehalt an Steroidhormonen durch LC-MS-MS im Steroidlabor des UKGMs (Leitung Prof. S. Wudy), bestimmt, so dass die Steroidprofile der verschiedenen Zelllinien verglichen werden konnten. Nachdem das Medium in Reaktionsgefäße überführt war, wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen, mit 500 μ l ddH₂O versetzt und die Zellen im Frier-Tau-Verfahren lysiert. Der Steroidgehalt im Zelllysate wurde ebenfalls über LC-MS-MS bestimmt. Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BCA-Assay Kit wie bereits in Kapitel 3.14.4 beschrieben. Die Angabe der gebildeten Steroidhormone, gemessen im Medium, erfolgte in pmol/mg Protein.

3.16 Immunfluoreszenz

Der Nachweis von SOAT in stabil transfizierten Zellen erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz. Ein Sekundärantikörper, an den ein Fluorochrom (fluoreszierender Farbstoff) gebunden ist, dient hierbei der Sichtbarmachung eines spezifisch gegen das Zielprotein gerichteten Primärantikörpers. Der Sekundärantikörper richtet sich gegen die Spezies, in der der Primärantikörper generiert wurde.

SOAT-JEG-3-, JEG-3-FRT- sowie SOAT-HEK293-Zellen (+ 1 μ g/ml Tetrazyklin) und FlpIn-HEK293-Zellen wurden auf Polylysin-beschichteten Deckgläschen in 24-Well-Platten bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert. Die folgenden Inkubationsschritte wurden lichtgeschützt in einer Box auf einem Taumler bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Waschschrte erfolgten mit 400 μ l PBS/Well, alle anderen Inkubationsschritte mit 250 μ l Reagenz/Well. Das Medium wurde abgezogen und die Zellen für 5 min mit 37 °C warmem PBS gewaschen. Es folgte die Fixation mit 2%igem Paraformaldehyd (PFA) für 15 min, die durch Waschen mit PBS für 2 x 5 min beendet wurde. Die Zellen wurden mit Puffer A

(20 mM Glycin in PBS) für 5 min inkubiert und anschließend mit 0,2 % Triton X-100 in Puffer A permeabilisiert. Es folgte eine 30-minütige Blockierung in Blockierlösung bestehend aus 1 % BSA in Puffer A mit 4 % Ziegen Serum. Glycin diente der Bindung von freien Aldehydgruppen aus der Paraformaldehydfixierung, die ansonsten Primär- und Sekundärantikörper binden und zu einer höheren Hintergrundfärbung führen. Das zugesetzte Serum richtete sich nach der Spezies, in der der Sekundärantikörper gebildet wurde (Ziege). Als Primärantikörper wurde der SLC10A6 C-13 Antikörper (Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:50 bis 1:200 in Blockierlösung verwendet und die Zellen 1 h damit inkubiert, während als Negativkontrolle Wells mit Blockierlösung ohne zugesetzten Primärantikörper inkubiert wurden. Durch dreimaliges Waschen mit PBS für 5 min wurde ungebundener Antikörper entfernt und die Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gebundenen Sekundärantikörper für 1 h angeschlossen. Hierzu diente der gegen Kaninchen-IgG gerichtete Antikörper *Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG* (Invitrogen) 1:800 in Blockierlösung. Erneut wurde unspezifisch gebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS für jeweils 5 min entfernt. Die Anfärbung von Kernen erfolgte mit DAPI/Methanol 1:5000 für 5 min. Anschließend wurden die Zellen 5 min mit Methanol gewaschen und unter dem Abzug trocknen gelassen. Mit einer im Brenner angeglühten Kanüle wurde der Boden der Wells durchstoßen und die Deckgläschen vom Boden gelöst. Anschließend wurden sie in 5 µl *ProLong Gold Antifade* (Invitrogen) auf Objektträger eingedeckelt, 24 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur getrocknet und bei 4 °C aufbewahrt. Die Beurteilung der Zellen und Aufnahme von Bildern erfolgte mit dem *Leica DM5500B* Fluoreszenzmikroskop und dem Programm *LAS AF6000* von Leica Microsystems.

3.17 Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran übertragen (Blotten) und ein spezifisches Protein mittels Antikörper nachgewiesen. In dieser Arbeit wurde die Methode zum Nachweis des SOAT-Proteins in stabil transfizierten SOAT-JEG-3-Zellen verwendet.

3.17.1 Proteinextraktion aus Zellen

Die Proteinextraktion aus Zellen wurde mit RIPA (*Radio-Immunoprecipitation Assay*)-Puffer (Sigma-Aldrich) durchgeführt, der sowohl Zelllyse als auch Lösen der Proteine ermöglicht. SOAT-JEG-3-, JEG-3-FRT-Zellen sowie SOAT-HEK293-Zellen wurden in jeweils zwei Petrischalen ausgesät und Proteine nach folgendem Protokoll extrahiert: Das Zellmedium wurde entfernt, die Zellen 3 x mit PBS gewaschen und 400 µl RIPA-Puffer pro Petrischale (mit Protease-Inhibitor 1:100, MBI Fermentas) auf den Zellrasen gegeben. Die Schalen

wurden für 15-20 min auf Eis gestellt und die Zellen durch gelegentliches Klopfen gelöst. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit einer Kanüle (Sterican 20Gx1½, Länge 40 mm Gr. 1, Braun) 10 x hoch- und runtergezogen. Das Zelllysate wurde 10 min auf Eis stehen gelassen, Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 17 900 x g (13 000 rpm) für 15 min bei 4 °C entfernt und der Überstand in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß gegeben. Die Proteinbestimmung erfolgte mittels BCA-Assay (Kapitel 3.14.4) und die Proben wurden bis zur Verwendung im Western Blot bei -80 °C aufbewahrt.

3.17.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine nach ihrer Molekularmasse aufgetrennt. Den Proteinen wird Lämmli-Puffer mit β -Mercaptoethanol und SDS (Sodiumdodecylsulfat) zugesetzt. β -Mercaptoethanol bewirkt eine Reduktion der Disulfidbrücken des Proteins und das negativ geladene SDS löst die hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb des Proteins auf, so dass Quartär-, Tertiär- und Sekundärstrukturen aufgehoben werden. Zudem wird die Eigenladung der Proteine überdeckt und der negativ geladene SDS-Protein-Komplex kann im elektrischen Feld aufgetrennt werden.

Gelherstellung:

Für die Proteinauftrennung wurde die diskontinuierliche Variante der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese gewählt, bestehend aus einem Sammelgel, in dem die Proteine zunächst zu einer scharfen Bande fokussiert werden, und einem Trenngel, in dem die Proteine nach Molekularmasse aufgetrennt werden. In der Gelkammer *PerfectBlue Doppelgelsystem Twin L* (PqLab) wurde ein 8,2%iges Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Ethanol überschichtet, so dass Luftblasen entfernt und eine gerade Oberfläche während der Polymerisation gebildet wurde. Nach 30-60 min wurde das Ethanol abgeschüttet, Flüssigkeitsreste mit einem Filterpapier entfernt und das Trenngel mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet. Die Schablone für die Probenaschen wurde eingesteckt und das Gel 30-45 min polymerisieren gelassen. Die Elektrophoresekammer wurde mit Tris-Glycin-SDS-Elektrophoresepuffer befüllt.

Elektrophorese:

60 μ g Protein von SOAT-JEG-3- und JEG-3-FRT-Zellen sowie 1,5 μ g Protein von SOAT-HEK293-Zellen als Positivkontrolle wurden mit 1/3 des Volumens mit 4 x Lämmli-Puffer versetzt und in die Probenaschen eingefüllt. Als Größenmarker dienten 5 μ l *Roti-Mark WESTERN Marker* (Roth) und als Farbmarker *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific). Der Farbmarker wurde an die Stelle gesetzt, an der die Membran später

auseinandergeschnitten werden sollte, um einen Teil der Membran mit Primärantikörper und einen Teil als Negativkontrolle ohne Primärantikörper zu inkubieren. Die Elektrophorese wurde zunächst bei 120 V durchgeführt, bis die blaue Laufrichtung das Trenngel erreicht hatte, und dann bei 160 V fortgesetzt. Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und das die aufgetrennten Proteine enthaltende Trenngel dem Gel-Blot unterzogen.

3.17.3 Proteintransfer (Gel-Blot)

Das im Trenngel aufgetrennte Protein wurde auf eine proteinbindende Nitrocellulosemembran (Amersham Hybond ECL, GE Healthcare, 0,45 µm Porengröße) mittels Elektro-Blot im Semi-Dry-Verfahren übertragen. Die Membran sowie neun Filterpapiere wurden auf Gelgröße zurechtgeschnitten und die Membran 10 min in Anodenpuffer eingeweicht, während das Gel in Kathodenpuffer überführt wurde. Jeweils drei Filterpapiere wurden in konzentriertem Anodenpuffer, in Anodenpuffer bzw. in Kathodenpuffer befeuchtet. In einem *PerfectBlue Semi-Dry-Elektroblotter* (Peqlab) wurde der Blot wie unter Abb. 3.3 aufgebaut:

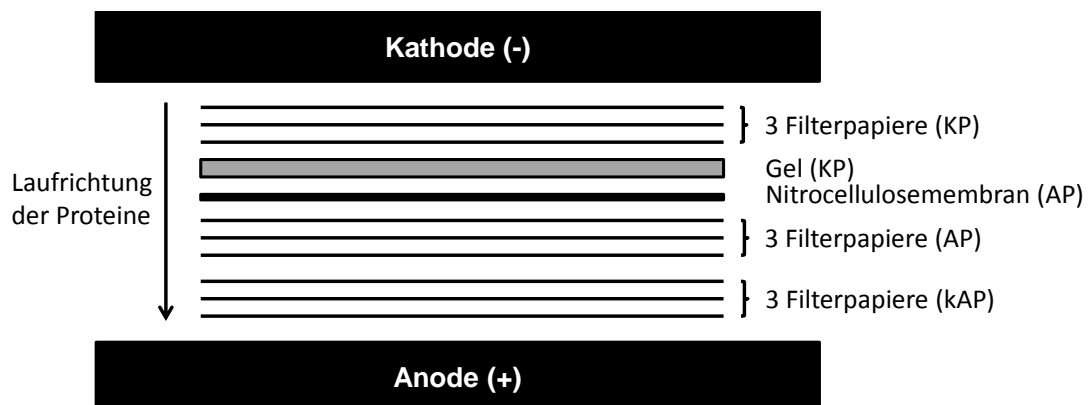


Abb. 3.3: Aufbau eines Semi-Dry-Elektroblot-Gelsandwiches

KP = Kathodenpuffer, AP = Anodenpuffer, kAP = konzentrierter Anodenpuffer

Hierbei wurde darauf geachtet, die Schichten frei von Luftblasen zu stapeln. Um eventuell zurückgebliebene Luftblasen zu entfernen, wurde vorsichtig mit einem 50 ml Reaktionsgefäß über den Stapel gerollt. Der Proteintransfer erfolgte für 2 h bei nach folgender Formel berechneter Stromstärke: $\text{Stromstärke in mA} = \text{Fläche der Membran in cm}^2 \times 1,5 \text{ mA/cm}^2$. Anschließend wurde der Proteintransfer durch Anfärben der Membran mit *Ponceau S Solution* (Sigma) überprüft, die mittels Waschen in TBS-T wieder entfernt wurde. Die Membran wurde über Nacht in TBS-T aufbewahrt.

3.17.4 Blockieren der Blotting-Membran und Antikörperreaktion

Um überschüssige Proteinbindungsstellen der Membran abzusättigen, wurde diese 1 h in 5%igem Milchpulver in TBS-T blockiert. Dieser sowie die folgenden Schritte wurden auf einem Taumler durchgeführt, um ein gleichmäßiges Verteilen der Flüssigkeit auf der Membran zu gewährleisten. Der Antikörper SOAT₃₁₁₋₃₇₇ wurde 1:100 in 5%igem Milchpulver verdünnt und die Membran 1 h bei Raumtemperatur damit inkubiert. Um Antikörper zu sparen, wurde die Membran in Plastikfolien eingeschweißt. Der Teil der Membran, der als Negativkontrolle diente, wurde mit 5%igem Milchpulver ohne Antikörper inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch Waschen der Membran in TBS-T für 2 x 5 min, 1 x 10 min und 3 x 5 min entfernt. Zur späteren Sichtbarmachung des gebundenen Primärantikörpers wurde die Membran mit dem Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörper *Peroxidase-conjugated Goat IGG Fraction to Rabbit IgG* (MP Biomedicals) und zur Sichtbarmachung des Größenmarkers mit dem Roti-Mark WESTERN HRP-Konjugat (Roth) inkubiert, beide in einer Verdünnung von 1:5000 in 5%igem Milchpulver für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgten mehrere Waschschrte in TBS-T nach dem zuvor genannten Zeitprotokoll, an die sich die Detektion anschloss.

Nach dem in Kapitel 3.17.6 beschriebenen Stripping und Wiederverwenden der Membran wurde der in dieser Arbeit gezeigte Western Blot mit dem Primärantikörper Anti-GAPDH (Sigma) 1:25 000 inkubiert. Als Sekundärantikörper diente *ZyMAX Rabbit anti-Goat IgG (H+L)-HRP* (Invitrogen) in einer Verdünnung von 1:5000.

3.17.5 Detektion

Der Nachweis der mit Meerrettichperoxidase (HRP, horse radish peroxidase)-gekoppelten Antikörper erfolgte mit dem Chemilumineszenz-Substrat Roti-Lumin (Roth). Gleiche Volumina von Roti-Lumin 1 und Roti-Lumin 2 wurden für 5 min miteinander inkubiert und auf die Membran aufgetragen. Nach 1 min wurde die Lösung entfernt, die Membran zwischen zwei durchsichtige Plastikfolien gelegt und in die Dunkelkammer verbracht. Die Membran wurde mit einem Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm ECL-Film, GE Healthcare) in eine Röntgenkassette gelegt. Hierbei wird das im Roti-Lumin enthaltene Substrat Luminol von der Meerrettichperoxidase umgesetzt, wobei Licht emittiert und der Röntgenfilm belichtet wird. Nach mehreren Minuten (abhängig von der Signalstärke) wurde der Film im Entwicklerbad *R09 One Shot B & W Film Developer* (Connect Chemicals) bis Sichtbarwerden des Signals geschwenkt, die Reaktion in 2%iger Essigsäure abgestoppt und im Schnellfixierer *Rapid Fixer* (Ilford) fixiert. Anschließend wurde der Film gewässert und getrocknet.

3.17.6 Stripping

Das Stripping bezeichnet das „Ausziehen“ der Western Blot-Membran, also das Entfernen von an der Membran gebundenen Antikörpern, so dass die Membran erneut mit einem Antikörper inkubiert werden kann. Hierzu wurde die Membran in Stripping-Röhrchen gelegt und 20 ml Stripping-Puffer sowie 156,2 µl β -Mercaptoethanol hinzugegeben. Während einer 30-minütigen Inkubation bei 50 °C in einem rotierenden Hybridisierungssofen wurden die Antikörper abgelöst und anschließend der Stripping-Puffer durch mehrmaliges Waschen der Membran in TBS-T vollständig entfernt. Die Membran wurde wie unter Kapitel 3.17.4 beschrieben blockiert und erneut mit Antikörper inkubiert.

3.18 Anfertigen histologischer Präparate

Das für *Laser-assisted cell picking*, Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung verwendete Plazentagewebe stammte aus dem dritten Schwangerschaftstrimester und wurde mit Formalin nach Lillie fixiert und in Paraffin eingebettet. Es wurde von Frau Prof. Dr. C. Pfarrer (Hannover) zur Verfügung gestellt (Ethikantrag 187a/09, Fachbereich Medizin, Justus-Liebig-Universität Gießen).

3.18.1 Anfertigen von Schnitten

Mit einem Rotationsmikrotom wurden 5 µm dicke Schnitte von Paraffinblöcken abgetrennt, bei 50 °C im Wasserbad zur Streckung gebracht und auf Objektträger aufgezogen. Die Trocknung erfolgte über Nacht im Trockenschrank bei 37 °C. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt oder für *Laser-assisted cell picking*, Immunhistochemie oder In-situ-Hybridisierung verwendet.

3.18.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.)

Bei dieser Färbung erscheinen saure, basophile Strukturen wie Zellkerne blauviolett, während basische, eosinophile Zellstrukturen wie Zytoplasmaproteine rosa erscheinen. Die Schnitte wurden zunächst nach folgendem Protokoll in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert: 3 x 10 min in Xylol, 5 min in 100 % Ethanol, 5 min in 96 % Ethanol, 5 min in 80 % Ethanol, 5 min in 70 % Ethanol, 5 min in 60 % Ethanol, 5 min in 50 % Ethanol und 5 min in dest. H₂O. Anschließend folgte die Färbung: 1 min in sterilfiltriertem Hämalaun, 10 min in fließendem Leitungswasser (Bläuen), 5 min in sterilfiltriertem Eosin G 0,5 % wässrig, gefolgt von kurzem Spülen in Leitungswasser. Die Schnitte wurden dann nach folgendem Protokoll dehydriert: Kurzes Spülen in 80 % Ethanol, kurzes Spülen in 96 % Ethanol, 2 x 2 min in 100 % Ethanol und 3 x 10 min in Xylol. Abschließend wurden die Präparate in erwärmter

Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt. Die in der Einleitung gezeigte Abbildung einer Chorionzotte (Abb. 1.2) wurde mit dieser Methode gefärbt.

3.19 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ermöglicht die Lokalisation von Proteinen in Gewebeschnitten. Ein spezifisch gegen das Protein gerichteter Primärantikörper wird über einen markierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht. In dieser Arbeit wurde SOAT in paraffinierten Plazentablöcken aus dem dritten Trimester nachgewiesen.

5 µm dicke Schnitte wurden wie unter Kapitel 3.18.1 angefertigt, entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert:

2 x 10 min Xylol

1 x 3 min 100 % Alkohol

1 x 3 min 96 % Alkohol

1 x 3 min 80 % Alkohol

1 x 3 min 70 % Alkohol

1 x 3 min dest. H₂O

Anschließend wurden die Schnitte 15 min in Citratpuffer in einer Mikrowelle bei 522 W gekocht (hitzeinduzierte Demaskierung). Nachdem die Schnitte abgekühlt waren, wurden sie 5 min in Tris-Waschpuffer gewaschen und zur Blockierung der endogenen Peroxidase 15 min mit 3%igem H₂O₂ vorbehandelt. Nach erneutem Waschen für 3 x 5 min erfolgte die Blockierung mit 1,4%iger BSA-Blockierlösung. Als Primärantikörper wurden SLC10A6 C-13 (Santa Cruz Biotechnology) und SOAT₃₁₁₋₃₇₇ (Eurogentec) eingesetzt, jeweils in einer Verdünnung von 1:100. Die Verdünnung erfolgte in BSA-Blockierlösung mit 5 % Ziegen Serum und es wurden 50 µl Antikörperlösung pro Schnitt eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Als Negativkontrolle erfolgte eine Peptidblockierung, bei der die Antikörper vor Zugabe auf die Schnitte 2 h mit 100-fach molarem Überschuss des zugehörigen Peptids inkubiert wurden. Als weitere Kontrolle wurden Schnitte nur mit BSA-Blockierlösung ohne Primärantikörper inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Objektträger 3 x 5 min in Tris-Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. 50 µl des Sekundärantikörpers *Polyclonal Goat anti-Rabbit Immunoglobulins/Biotinylated E0432* (Dako) in einer Verdünnung von 1:200 in Tris-Waschpuffer wurden auf die Schnitte pipettiert und für 1 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Erneutes Waschen für 3 x 5 min entfernte überschüssigen Sekundärantikörper und gebundener Antikörper wurde über die Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode sichtbar gemacht. Hierzu wurden die Schnitte zunächst mit 1 Tropfen ABC-Komplex-Lösung für 45 min inkubiert, so dass darin enthaltenes Avidin mit seinen Biotin-

Bindungsstellen an den biotinylierten Sekundärantikörper binden konnte. Zusätzlich bindet das Avidin Biotin-Peroxidasekomplexe, die im nächsten Schritt von Bedeutung sind. Nach erneutem Waschen für 3 x 5 min wurden 50 µl des Peroxidase-Substrates 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) auf die Schnitte gegeben, welches von der Peroxidase zu einem rotbraunen Farbstoff umgesetzt wird. Die Farbentwicklung wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und die Schnitte nach ausreichender Färbung mit dest. H₂O gereinigt. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Häkalaunlösung für 5–10 s, woraufhin die Schnitte für 5 min in Leitungswasser gestellt und abschließend mit dest. H₂O gereinigt wurden. Das Eindeckeln der Objektträger mit Deckgläschen erfolgte in erwärmter Kaisers Glyceringelatine.

3.20 Laser-assisted cell picking (LACP)

Die Technik *Laser-assisted cell picking* ermöglicht eine Isolierung von Strukturen aus einem Gewebeschnitt und Nachweis von RNA mittels qualitativer RT-PCR. Das Gerät *PALM MicroBeam* mit der Software PALM Robo von Zeiss AG wurde am Institut für Anatomie und Zellbiologie (Prof. Dr. Meinhardt, Zugang durch Prof. Dr. Bergmann) benutzt.

3.20.1 Herstellung der Präparate

Die Gewebeschnitte wurden auf spezielle Objektträger aufgezogen, die mit einer dünnen Membran überzogen waren (MembraneSlide 1.0 PEN Objektträger). Zur Vorbereitung wurden die Objektträger 30 min mit UV-Licht bestrahlt. Dadurch wurde die Membran hydrophiler und die Schnitte hafteten später besser an der Membran. Außerdem diente es der Sterilisation und Zerstörung kontaminierender Nukleinsäuren. Das Mikrotom wurde mit 70%igem Alkohol gereinigt und das paraffinierte Gewebe mit einer sterilen Klinge so weit angeschnitten, bis eine saubere Schnittfläche vorlag. 5 µm dicke Schnitte wurden auf die Membran aufgezogen, bei 50 °C im Wasserbad gestreckt und über Nacht bei 37 °C im Wärmeschränk getrocknet. Vor Durchführung des LACP wurden die Schnitte nach folgendem Protokoll mit Xylol deparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert:

Auftropfen von reinem Xylol für 2 x 2 min

Auftropfen von 100 % Ethanol für 1 min

Auftropfen von 96 % Ethanol für 1 min

Auftropfen von 70 % Ethanol für 1 min

Auftropfen von DEPC-H₂O für 1 min

Es folgte die Färbung und Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe:

Auftropfen von sterilfiltriertem Hämatoxylin für ca. 25-30 s

Abspülen des Hämatoxylins mit DEPC-H₂O und Wässern für 30 s

Auftropfen von 70 % Ethanol für 10 s

Auftropfen von 96 % Ethanol für 10 s

Auftropfen von 100 % Alkohol für 10 s

Der Transport der Objektträger erfolgte in sterilen 50 ml Sarstedt-Röhrchen.

3.20.2 Gewinnung der Proben mittels LACP

Zum Isolieren von Gewebe aus dem vorbereiteten Präparat wurde der Objektträger an dem Mikroskop *Palm Micro Beam* eingespannt und die Deckelinnenseite eines Probengefäßes (*MicroTube 500*, Zeiss) mit 2,5 µl Mineralöl benetzt, um ein späteres Haften der Gewebestücke zu gewährleisten. Das Probengefäß wurde oberhalb des Objektträgers befestigt, so dass die Deckelinnenseite direkt über dem Gewebeschnitt schwebte. Die Software *PALM Robo* ermöglichte ein Umfahren des erwünschten Gewebeareals am Bildschirm, das anschließend mittels Laserstrahl ausgeschnitten und in den Deckel des Probengefäßes katapultiert wurde. Auf diese Weise wurden Synzytiotrophoblast und Blutgefäße aus den Chorionzotten getrennt gesammelt, wobei zu beachten war, dass beide Gewebearten nicht völlig frei von benachbartem Bindegewebe isoliert werden konnten. Bis zur weiteren Aufbereitung wurden die Proben bei -80 °C gelagert. Die RNA-Isolierung, Umschreibung in cDNA sowie die RT-PCR sind in den Kapiteln 3.6.2, 3.7.2 und 3.9.2 beschrieben.

3.21 In-situ-Hybridisierung

Bei der In-situ-Hybridisierung kann mit Hilfe einer Nukleinsäuresonde mRNA in histologischen Präparaten nachgewiesen werden. Sie wurde in dieser Studie an Paraffinschnitten von humaner Plazenta aus dem dritten Trimester durchgeführt und die Genexpression von SOAT mit einer Digoxigenin (DIG)-markierten RNA-Sonde untersucht.

3.21.1 Herstellung der Sonde

Die Herstellung der SOAT-Antisense- und Sense-Sonde erfolgte im Labor von Prof. M. Bergmann (Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der JLU Gießen) durch Dr. K. Hartmann. Die Antisense-Sonde enthält eine zur Ziel-mRNA komplementäre Sequenz und dient dem Nachweis der gesuchten mRNA auf zellulärer Ebene, während die Sense-Sonde zur Ziel-mRNA identisch ist und als Negativkontrolle dient. Zunächst wurde ein 153 bp PCR-Produkt von SOAT mit den Primer-Paaren 5'-GGTCCAGATGGTGAGTTTCC-3'

und 5'-TTCCTCGTATGGCAGACTTC-3' hergestellt. Dieses wurde nach Herstellerprotokoll in die *multiple cloning site* des pCRII-TOPO-Vektors (Invitrogen) ligiert, die von den RNA-Polymerasepromotoren SP6 und T7 flankiert wird. Nach Transformation in *One Shot Chemically Competent E. coli* (Invitrogen) und Plasmidextraktion wurde das Plasmid mit BamHI bzw. XhoI (NEB) im Restriktionsendonukleaseverdau linearisiert und das Enzym 20 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. Es folgte die In-vitro Transkription mit der T7- oder SP6-RNA-Polymerase (Promega) in Anwesenheit von Digoxigenin-markierten dUTPs: Hierzu wurden 7 µl DEPC-H₂O, 4 µl 5 x Transkriptionspuffer, 0,5 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl), 2 µl 100 mM DTT (Promega), 2 µl 10 x DIG-RNA-Labeling-Mix (Roche), 3 µl Plasmid aus dem Restriktionsendonukleaseverdau und 2 µl RNA-Polymerase zusammenpipettiert und für 2 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Für das mit XhoI geschnittene Plasmid wurde die SP6-Polymerase und für das mit BamHI geschnittene Plasmid die T7-Polymerase eingesetzt. Anschließend wurde die Polymerase-Aktivität durch Zugabe von 0,5 µl 0,5 M EDTA-Lösung gestoppt. Die Fällung der RNA-Sonden erfolgte durch Zugabe von 1,2 µl 8 M LiCl-Lösung und 70,7 µl eiskaltem 96%igem Ethanol und Inkubation bei -80 °C für 1 h. Die Proben wurden für 20 min bei 18 500 x g (13 200 rpm) bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgezogen und das Pellet mit 200 µl 70%igem Ethanol (in DEPC-H₂O) gewaschen und 15 min bei 18 500 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach erneutem Abziehen des Überstandes wurden die Pellets im Trockenschrank bei 37 °C getrocknet und mit jeweils 50 µl DEPC-H₂O im Wasserbad bei 70 °C für 10-15 min resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.21.2 Durchführung der In-situ-Hybridisierung

Paraffinschnitte einer humanen Plazenta aus dem dritten Trimester mit 5 µm Dicke wurden auf Objektträger aufgezogen und im Trockenschrank über Nacht getrocknet.

Tag 1:

Vorbereitung:

Am Tag 1 der In-situ-Hybridisierung wurden ausschließlich DEPC-behandeltes H₂O und RNase-freie Lösungen verwendet, um die Stabilität der Sonde zu gewährleisten. Die Schnitte wurden wie folgt entparaffiniert und rehydriert:

3 x 10 min in Xylol

2 x 5 min in 100 % Ethanol

1 x 5 min 96 % Ethanol

1 x 5 min in 70 % Ethanol

1 x 5 min DEPC-H₂O

Es folgte eine 20-minütige Inkubation in 0,2 M HCl-Lösung, die durch Inaktivierung basischer Proteine auf der RNA unspezifische Bindungen der Sonde vermindert. Anschließend wurden

die Schnitte in 2 x SSC bei 70 °C inkubiert, gefolgt von einem Waschschrift in PBSM für 5 min. Zur Permeabilisierung wurden die Schnitte mit 30 µg/ml Proteinase K für 20 min bei 37 °C inkubiert, die Proteinase K mit 0,2%iger Glycin-Lösung für 5 min gestoppt und die Schnitte anschließend für 5 min in PBSM gewaschen. Die Nachfixierung erfolgte in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung, gefolgt von einem Waschschrift in PBSM und Acetylierung in 0,25%igem Essigsäureanhydrid in Triethanolamin (10 mM) für 10 min zur Reduktion von Hintergrundfärbung. Die Vorbereitung der Schnitte wurde mit einem weiteren Waschschrift in PBSM für 5 min beendet.

Prähybridisierung:

Die Prähybridisierung erfolgte in 20%igem Glycerin in DEPC-H₂O für 30-60 min.

Hybridisierung:

Zunächst wurden ein Sonden-Gemisch und der Hybridisierungspuffer vorbereitet. Das Sondengemisch für einen Schnitt (50 µl) bei einer Verdünnung der Sonde von 1:50 bestand aus 0,5 µl Lachssperma-DNA, 1 µl Hefe-tRNA und 1 µl DIG-cRNA-Antisense- bzw. Sense-Sonde (Negativkontrolle). Für den Hybridisierung-Puffer wurden DEPC-H₂O, 20 x SSC und 50 % Dextransulfat in einem Heizblock bei 70 °C erwärmt. 6,5 µl DEPC-H₂O, 5 µl 20 x SSC, 10 µl 50 % Dextransulfat, 1 µl Dehnhardt-Reagenz sowie 25 µl deionisiertes Formamid wurden zusammengegeben und bis zur Verwendung in den Heizblock bei 70 °C gestellt. Dextransulfat verringert durch seine hydratisierende Eigenschaft das zum Lösen der Sonde verfügbare Wasser, so dass die effektive Sondenkonzentration ansteigt und die Hybridisierungsrate erhöht wird. Formamid senkt die Schmelztemperatur der Nukleinsäurestränge, wodurch die Hybridisierung bei einer niedrigeren Temperatur durchgeführt werden kann. Die Schnitte wurden kurz in 2 x SSC getaucht, 10-12 min auf eine 70 °C warme Heizplatte gelegt und auf einem Kühlakku abgeschreckt. Gleichzeitig wurde das Sondengemisch zur Hitzedenaturierung 10-12 min in einen 70 °C warmen Heizblock gestellt und auf Eis abgeschreckt. Sondengemisch und Hybridisierungspuffer wurden zusammengegeben und auf die Schnitte gegeben, die mit einem sterilen Deckgläschen bedeckt wurden. Die Hybridisierung fand bei 55 °C in einer feuchten Kammer (50 % Formamid) über Nacht statt.

Tag 2:

Posthybridisierung:

Die Deckgläschen wurden mit Hilfe einer Einmal-Pipette und 4 x SSC abgespült und die Objektträger 4 x 10-15 min in 4 x SSC gewaschen, um ungebundene Sonde zu entfernen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation mit RNaseA/RNaseT1 bei 37 °C, während der einzelsträngige, ungebundene RNA verdaut wurde. Hierzu wurden 200 µl der 10 x

RNaseA/RNaseT1-Stammlösung mit 1,8 ml 4 x SSC verdünnt und 50 µl auf die Schnitte pipettiert. Folgende Waschschrte schlossen sich an:

4 x 5 min in 4 x SSC, 37 °C

15-20 min in 2 x SSC, 64 °C

15-20 min in 0,2 x SSC, 45 °C

5 min in 0,1 x SSC, Raumtemperatur

5 min in 2 x SSC, Raumtemperatur

Immunhistochemie:

Die Präparate wurden 10 min mit 1 x TNMT inkubiert und für 1 h in 3%iger BSA-Blockierlösung blockiert. Es folgte die Inkubation mit dem Alkalische Phosphatase-konjugierten Antikörper *Anti-Digoxigenin-AP, Fab-fragments* (Roche) in 1%igem BSA-Blockpuffer 1:500 verdünnt in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C (1332 µl 1 x TNMT + 666 µl 3 % BSA + 4 µl Antikörper). Während dieser Zeit konnte der gegen Digoxigenin gerichtete Antikörper an die Digoxigenin-markierte Sonde binden.

3. Tag:

Fortsetzung Immunhistochemie:

Die Objektträger wurden 2 x 10 min in 1 x TNMT gewaschen, gefolgt von 5 min in 1 x NTB-Puffer und 5 min in 1 x NTB-Puffer + Levamisol (50 ml 1 x NTB + 250 µl 1 M Levamisol). Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (NBT/BCIP)-Lösung wurde sterilfiltriert, auf die Schnitte getropft und unter Lichtausschluss ca. 4 h inkubiert. Der an der Sonde gebundene Antikörper ist mit Alkalischer Phosphatase konjugiert, die in diesem Schritt die Umsetzung des Farbstoffs NBT/BCIP vornimmt. Anschließend wurden die Schnitte 5 min in 1 x NTB + Levamisol gewaschen, in ddH₂O gestellt und schließlich in erwärmter Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt.

4 ERGEBNISSE

Die humane Plazenta bezieht sulfatierte Steroide, wie DHEAS, aus dem fetalen und maternalen Blut und wandelt diese in Östrogene um (Siiteri und MacDonald 1966). Die Aufnahme von sulfatierten Steroiden in den Synzytiotrophoblasten, in dem die Östrogensynthese stattfindet, erfolgt über verschiedene Transporter. In dieser Arbeit wurde der Steroidsulfattransporter SOAT in der Plazenta auf zellulärer Ebene lokalisiert (Kapitel 4.1). Des Weiteren erfolgte die Identifizierung von Transportern, die die Estriolvorstufe 16 α -OH-DHEAS transportieren und damit die Voraussetzung für die hohe Synthese von Estriol in der Plazenta darstellen (Kapitel 4.2). Zusätzlich wurden Transporter in der Chorionkarzinomzelllinie JEG-3 untersucht, die als Modell für humane Trophoblasten diente (Kapitel 4.3–4.5).

4.1 Lokalisation von SOAT in der humanen Plazenta

Die höchste Expression des Steroidsulfattransporters SOAT liegt im Hoden vor, doch auch in der humanen Plazenta wurde eine Expression nachgewiesen (Geyer et al. 2007). Die Untersuchung der zellulären Lokalisation von SOAT erfolgte an paraffineingebetteten und formalinfixierten humanen Plazentaschnitten aus dem dritten Trimester. Wie die nachfolgenden Abbildungen zeigen, kommt SOAT im Synzytiotrophoblasten vor, insbesondere in der apikalen Membran, sowie im Gefäßendothel innerhalb der Chorionzotten.

4.1.1 Nachweis von SOAT-mRNA mittels Laser-assisted cell picking (LACP) und In-situ-Hybridisierung

Beim LACP wurden Gewebeareale innerhalb einer Chorionzotte mittels Kaltlasers herausgeschnitten, RNA isoliert und die SOAT-Expression dieser Bereiche in einer RT-PCR untersucht. Bei den untersuchten Gewebearealen handelte es sich um Synzytiotrophoblasten (Abb. 4.1 A) und Endothel (Abb. 4.1 B), die getrennt voneinander isoliert wurden. Hierbei wurde stets ein Sicherheitsabstand zum Zielgewebe gehalten, um zu verhindern, dass die Zellen durch den Laser zerstört wurden. Somit ist zu berücksichtigen, dass die Proben neben dem Zielgewebe auch Bindegewebsanteile enthielten. Sowohl in den Proben mit Synzytiotrophoblasten als auch in den Endothelproben konnte mittels RT-PCR eine SOAT-Expression nachgewiesen werden (Abb. 4.1 C).

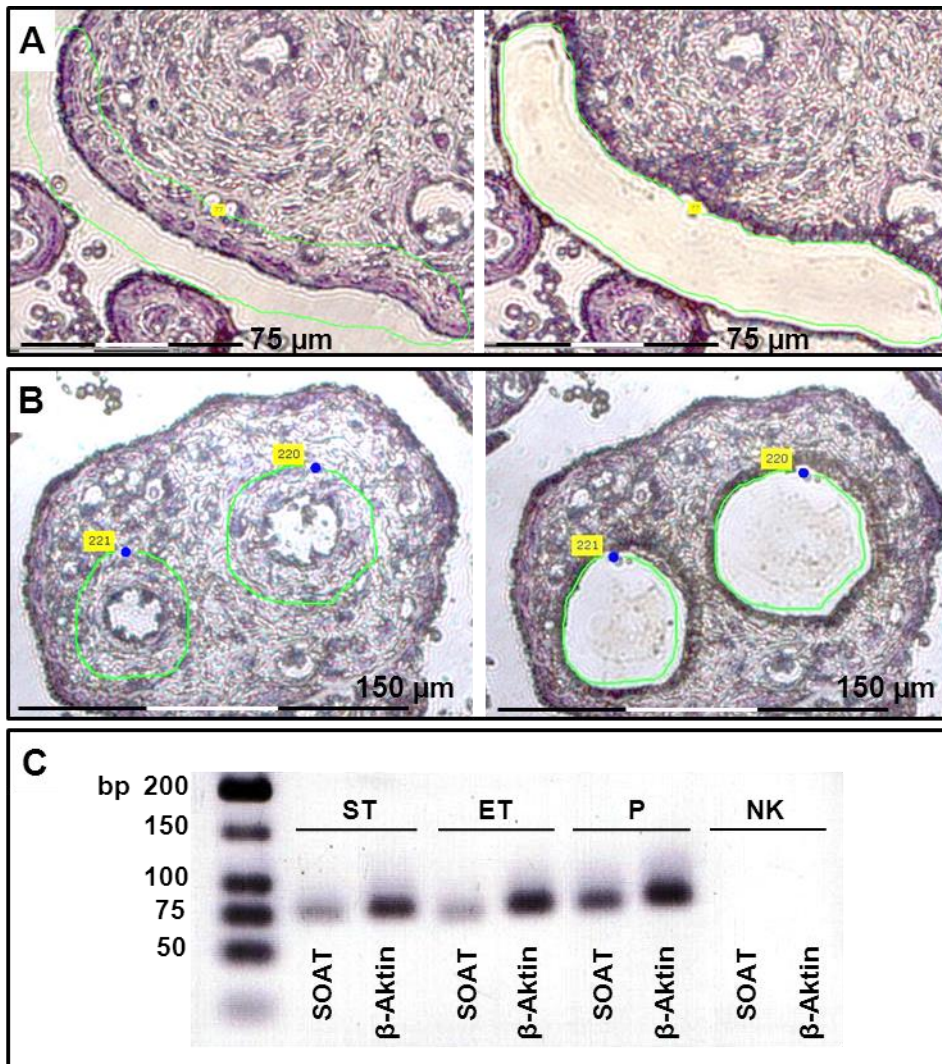


Abb. 4.1: LACP aus humaner Plazenta vom dritten Trimester

In den Chorionzotten wurden Synzytiotrophoblasten (A) oder Gefäßendothel (B) mit der Software *Palm Robo* grün markiert (A, B, linkes Bild) und mittels Kaltlasers im *Palm Micro Beam* Mikroskop ausgeschnitten (A, B, rechtes Bild). Nach Isolierung der RNA wurde eine RT-PCR durchgeführt (C) und SOAT sowohl in Synzytiotrophoblastproben (ST) als auch in Endothelproben (ET) nachgewiesen. Als Positivkontrolle diente ein vollständiger Plazentaschnitt (P), der mit dem gleichen Verfahren wie die LACP-Proben aufgearbeitet wurde. Für die Negativkontrolle (NK) wurde ddH₂O anstelle von cDNA bei der PCR eingesetzt. Als Qualitätskontrolle der cDNA diente das Kontrollgen β -Aktin. A: Primäre Vergrößerung 40 x, B: Primäre Vergrößerung 20 x.

In der In-situ-Hybridisierung einer Plazenta aus dem dritten Trimester wurde eine SOAT-spezifische cRNA-Antisense-Sonde eingesetzt, die eine komplementäre Sequenz zur SOAT-mRNA hat und daher mit dieser hybridisieren kann. Diese Sonde wies SOAT-mRNA im Synzytiotrophoblasten und Gefäßendothel nach, während Zytotrophoblasten ungefärbt blieben (Abb. 4.2 A, B). Bei den Zytotrophoblasten handelt es sich um die Vorgängerzellen des Synzytiotrophoblasten, die durch Fusion mit diesem ein Teil des Synzytiums werden. Als Negativkontrolle diente eine SOAT-spezifische cRNA-Sense-Sonde, deren Sequenz mit der SOAT-mRNA identisch ist und die keine Färbung verursachte (Abb. 4.2 C).

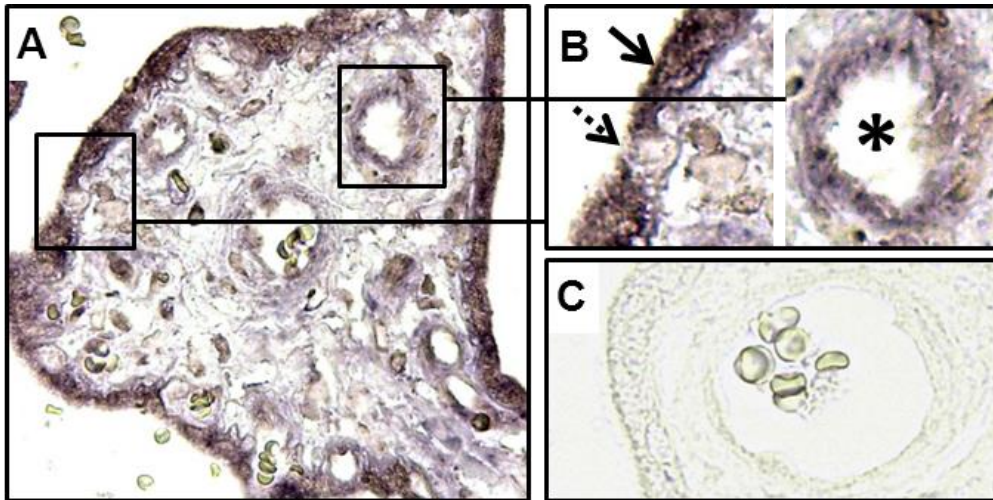


Abb. 4.2: In-situ-Hybridisierung von SOAT-mRNA in humaner Plazenta aus dem dritten Trimester

Das linke Bild (A) zeigt in einer Übersicht eine Chorionzotte. Rechts oben (B) befindet sich eine Detailansicht des gefärbten Synzytiotrophoblasten (gefüllter Pfeil), des ungefärbten Zytotrophoblasten (gepunkteter Pfeil) und des gefärbten Endothels (Stern). Eingesetzt wurde hierbei eine SOAT-spezifische Digoxigenin-markierte cRNA-Antisense-Sonde. Unten rechts (C) befindet sich die Negativkontrolle, bei der eine Digoxigenin-markierte SOAT-cRNA-Sense-Sonde verwandt wurde. Beide Sonden wurden in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt. Zur Visualisierung der gebundenen Sonde diente ein gegen Digoxigenin gerichteter und mit Alkalischer Phosphatase-konjugierter Antikörper in Verbindung mit dem Farbstoff NBT/BCIP. Die Plazenta stammte aus der 36. Schwangerschaftswoche. Primäre Vergrößerung 40 x.

4.1.2 Immunhistochemischer Nachweis des SOAT-Proteins

Die immunhistochemische Untersuchung von Plazentaschnitten erfolgte mit den Antikörpern SLC10A6 C-13 von Santa Cruz Biotechnology (Abb. 4.3 A-C) und SOAT₃₁₁₋₃₇₇ von Eurogentec (Abb. 4.3 D-F). Der SLC10A6 C-13-Antikörper ist gegen Teile des C-Terminus des SOAT-Proteins gerichtet, der SOAT₃₁₁₋₃₇₇-Antikörper gegen den kompletten C-Terminus. Dieser befindet sich auf der intrazellulären Seite des SOAT-Proteins, während der N-Terminus extrazellulär lokalisiert ist (Geyer et al. 2007). Beide Antikörper ermöglichten in den Chorionzotten eine Färbung des Synzytiotrophoblasten und des Gefäßendothels. Der SLC10A6 C-13-Antikörper färbte zudem verstärkt die apikale Membran des Synzytiotrophoblasten an, die dem maternalen Blutraum zugewandt ist. Zytotrophoblasten, die Vorgängerzellen der Synzytiotrophoblasten, wurden durch den SLC10A6 C-13-Antikörper schwach angefärbt, während der SOAT₃₁₁₋₃₇₇-Antikörper keine Färbung dieser Zellen hervorrief. Der SOAT₃₁₁₋₃₇₇-Antikörper färbte das Gefäßendothel am intensivsten an (Abb. 4.3 B, E). Als Negativkontrollen wurden die Primärantikörper mit 100-fach molarem Überschuss des immunisierenden Peptids präinkubiert (Abb. 4.3 C, F) sowie ein Ansatz ohne Inkubation mit Primärantikörper durchgeführt, wobei sich in beiden Fällen keine Färbung ergab.

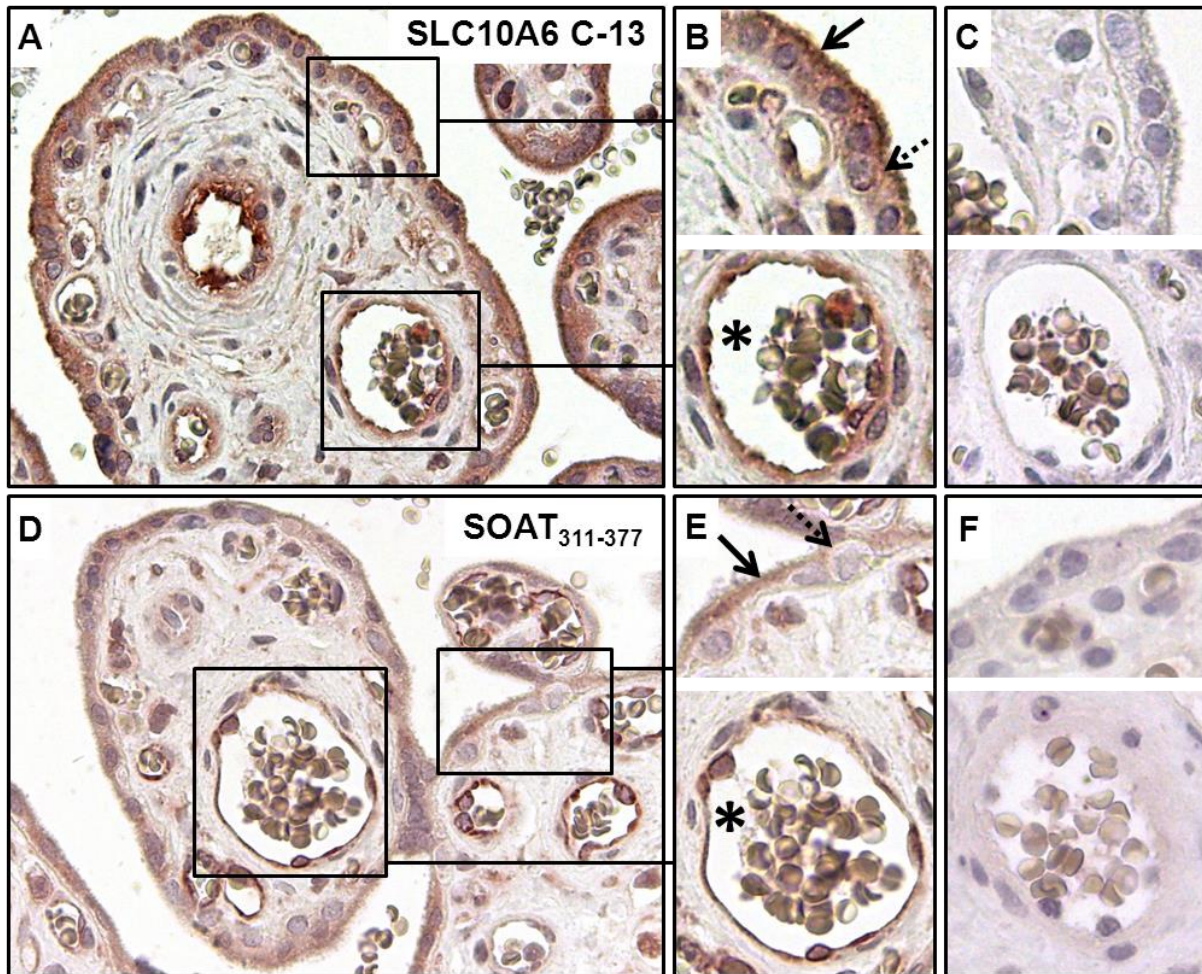


Abb. 4.3: Immunhistochemische Lokalisierung von SOAT in humaner Plazenta aus dem dritten Trimester

Die immunhistochemische Untersuchung erfolgte mit den Antikörpern SLC10A6 C-13 (A-C) und SOAT₃₁₁₋₃₇₇ (D-F). Die linken Bilder zeigen in einer Übersicht die Chorionzotten (A, D), daneben befinden sich daraus Detailansichten (B, E). Diese zeigen den gefärbten Synzytiotrophoblasten (gefüllter Pfeil), Zytotrophoblasten (gepunkteter Pfeil) und gefärbtes Gefäßendothel (Stern). Rechts befinden sich die Negativkontrollen (C, F), bei denen der Primärantikörper mit dem zugehörigen Peptid präinkubiert wurde, das in 100-fach molarem Überschuss vorlag. Beide Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Die Färbung erfolgte unter Anwendung der Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode mit dem Farbstoff AEC und Hämatoxylin-Gegenfärbung. Die Immunhistochemie wurde an zwei Plazenten aus dem dritten Trimester durchgeführt, mit vergleichbarem Ergebnis. Die dargestellte Plazenta stammt aus der 36. Schwangerschaftswoche. Primäre Vergrößerung 40 x.

4.2 Identifizierung der Transporter für 16 α -OH-DHEAS

Der Fokus dieses Unterkapitels ist auf das vom Fetus gebildete 16 α -OH-DHEAS gerichtet, das als Vorläufermolekül für die plazentare Synthese von Estriol herangezogen wird. Estriol wird auch als „Schwangerschaftsöstrogen“ des Menschen bezeichnet, da es in hohen Konzentrationen während der Schwangerschaft gebildet wird. Welche Transporter die Aufnahme von 16 α -OH-DHEAS vermitteln und das Substrat damit dem estriolproduzierenden Synzytiotrophoblasten zuführen, war bislang unklar. Als Kandidatencarrier wurden die Transporter SOAT, OAT4 und OATP2B1 untersucht, da sie sulfatierte Steroide in ihrem Substratspektrum enthalten und in der Plazenta exprimiert werden (St-Pierre et al. 2002; Ugele et al. 2003; Geyer et al. 2007). Zusätzlich wurden die beiden Gallensäuretransporter NTCP und ASBT untersucht, die aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit zu SOAT von Interesse waren. Als Grundlage für die Messungen dienten HEK293-Zellen, die stabil mit den genannten Transportern transfiziert waren. Wie die folgenden Messungen zeigen, wurden die Transporter SOAT, OAT4 und NTCP als Transporter für 16 α -OH-DHEAS identifiziert.

4.2.1 Darstellung der Genexpression von stabil mit Transportern transfizierten HEK293-Zelllinien

Um die Genexpression der stabil transfizierten SOAT-, OAT4-, OATP2B1-, NTCP- und ASBT-HEK293-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen in einer qRT-PCR auf ihr jeweiliges Insert überprüft und mit untransfizierten FlpIn-HEK293-Kontrollzellen verglichen (Abb. 4.4). Es zeigte sich eine massive Überexpression der Transporter in den stabil transfizierten Zelllinien, während die Expression in den FlpIn-HEK293-Zellen sehr gering war. Die Genexpression der jeweiligen transfizierten Transporter lag bei SOAT-, OAT4-, NTCP- und ASBT-HEK293-Zellen auf ähnlichem Niveau mit einer ca. 130 000-fach höheren Expression als die Expression von OATP2B1 in FlpIn-HEK293-Zellen (Kalibrator). Die Genexpression von OATP2B1 in OATP2B1-HEK293-Zellen war ca. 270 000-fach höher.

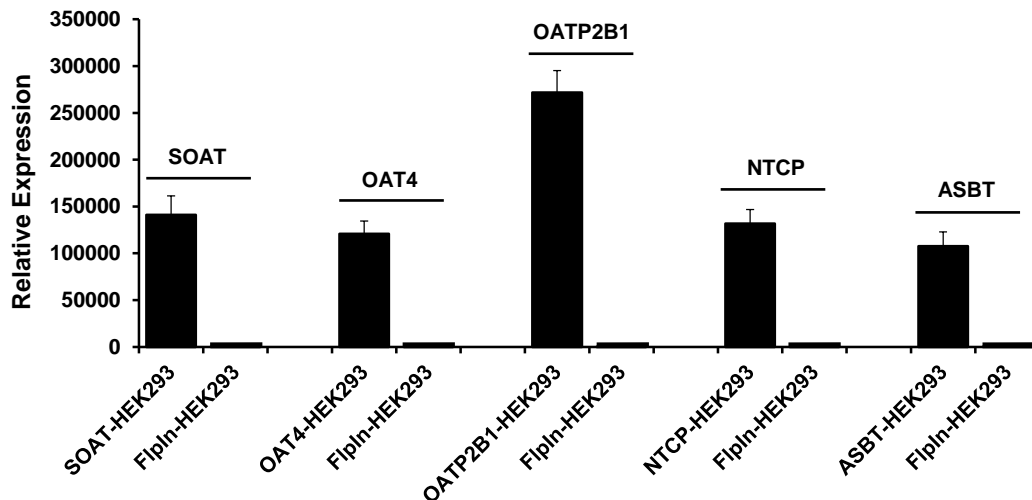


Abb. 4.4: Überprüfung der Expression von stabil transfizierten SOAT-, OAT4-, OATP2B1-, NTCP- und ASBT-HEK293-Zellen sowie FlpIn-HEK293-Zellen mittels qRT-PCR

Zur Induktion der Genexpression wurden die Zellen drei Tage mit Tetrazyklin inkubiert und anschließend RNA isoliert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und in der Real-Time qRT-PCR auf ihr jeweiliges Insert überprüft. Als Kontrolle dienten FlpIn-HEK293-Zellen. Die relative Expression wurde mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode bestimmt. Hierbei wurde β -Aktin als Referenzgen eingesetzt und die am niedrigsten vorkommende Expression als Kalibrator gesetzt, in diesem Fall die Expression von OATP2B1 in FlpIn-HEK293-Zellen. Die dargestellten Werte zeigen somit eine x-fach höhere Expression als die Expression von OATP2B1 in FlpIn-HEK293-Zellen an. Die Werte wurden in Dreifachbestimmung ermittelt und die MW \pm SE angegeben.

4.2.2 Aufnahmemessungen mit 16α -OH-DHEAS

Zur Identifizierung der Transporter, die 16α -OH-DHEAS aufnehmen, wurden stabil transfizierte SOAT-, OAT4-, OATP2B1-, NTCP-, und ASBT-HEK293-Zellen mit 16α -OH-DHEAS inkubiert und die aufgenommene Substanz im Zelllysate über LC-MS-MS analysiert (Abb. 4.5 A). Hierbei zeigte sich nach 30 min für OAT4 eine partiell natriumabhängige Aufnahme, mit einer 59-fachen Erhöhung gegenüber den FlpIn-HEK293-Kontrollzellen. In Abwesenheit von Natrium sank die Aufnahme auf etwa die Hälfte. SOAT und NTCP zeigten nur in Anwesenheit von Natrium eine Aufnahme, die 45-fach (SOAT) bzw. 283-fach (NTCP) gegenüber der Kontrolle erhöht war. Bei OATP2B1 und ASBT war hingegen keine Aufnahme ermittelbar. Um die Aufnahme von 16α -OH-DHEAS durch OAT4, SOAT und NTCP zu hemmen, wurde Bromosulphophthalein (BSP) eingesetzt, bei dem es sich um einen Inhibitor dieser Carrier handelt (Cha et al. 2000; Hagenbuch und Meier 2004; Geyer et al. 2007). Hierzu wurden die Zellen zunächst mit BSP präinkubiert und anschließend 16α -OH-DHEAS hinzugefügt. BSP lag hierbei in einer 100-fach höheren Konzentration verglichen mit 16α -OH-DHEAS vor. Auf diese Weise konnte die Aufnahme von 16α -OH-DHEAS vollständig gehemmt werden (Abb. 4.5 B).

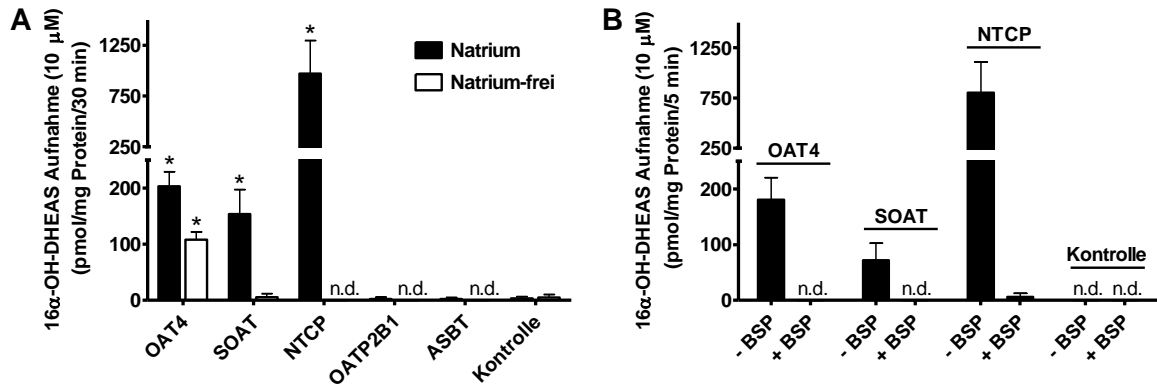


Abb. 4.5: Aufnahme von 16α-OH-DHEAS in stabil transfizierten OAT4-, SOAT-, NTCP-, OATP2B1- und ASBT-HEK293-Zellen

(A) Stabil transfizierte OAT4-, SOAT-, NTCP-, OATP2B1-, und ASBT-HEK293-Zellen sowie FlpIn-HEK293-Zellen (Kontrolle) wurden 30 min mit 10 μM 16α-OH-DHEAS bei 37 °C in natriumhaltigem (schwarze Balken) oder natriumfreiem (weiße Balken) Transportpuffer inkubiert. Anschließend wurde das Substrat abgekippt, die Zellen in eiskaltem PBS gewaschen, mit der Frier-Tau-Methode lysiert und das Zelllysate mittels LC-MS-MS analysiert. * Für OAT4, SOAT und NTCP-HEK293-Zellen war die Aufnahme signifikant gegenüber den FlpIn-HEK293-Kontrollzellen erhöht ($p < 0,001$; zweiseitiger ungepaarter t-Test). Angegeben sind die $MW \pm SD$ von mindestens zwei unabhängigen Experimenten, jeweils in Dreifachbestimmung. **(B)** Die Aufnahme von 10 μM 16α-OH-DHEAS über 5 min bei 37 °C in OAT4-, SOAT- und NTCP-HEK293-Zellen wurde durch 5-minütige Präinkubation der Zellen mit dem Substrat BSP gehemmt. Dieses wurde in 100-fach molarem Überschuss (1 mM) gegenüber 16α-OH-DHEAS eingesetzt. Die Werte entsprechen $MW \pm SD$ zweier unabhängiger Experimente, jeweils in Dreifachbestimmung. Die Grenze für eine Quantifizierung mittels LC-MS-MS lag bei 0,5 ng/ml. Dies entspricht in den hier durchgeführten Messungen etwa 3 pmol/mg Protein. Werte unterhalb dieser Grenze sind als n.d. (nicht detektierbar) dargestellt.

Die Bestimmung der konzentrationsabhängigen Aufnahme von 16α-OH-DHEAS in OAT4-, SOAT- und NTCP-HEK293-Zellen erfolgte durch Inkubation der Zellen mit steigenden Konzentrationen an 16α-OH-DHEAS für 1 min (Abb. 4.6). Der Sättigungsverlauf war charakteristisch für eine Michaelis-Menten-Kinetik und die kinetischen Parameter wurden über nicht-lineare Regressionsanalyse ermittelt. Die Michaeliskonstante K_m gibt die Konzentration an, bei der die halbmaximale Aufnahmegeschwindigkeit erreicht ist, während V_{max} die maximale Aufnahmegeschwindigkeit bezeichnet. Die kinetischen Parameter für OAT4-, SOAT- und NTCP-HEK293-Zellen sind in Tab. 4.1 vergleichend dargestellt.

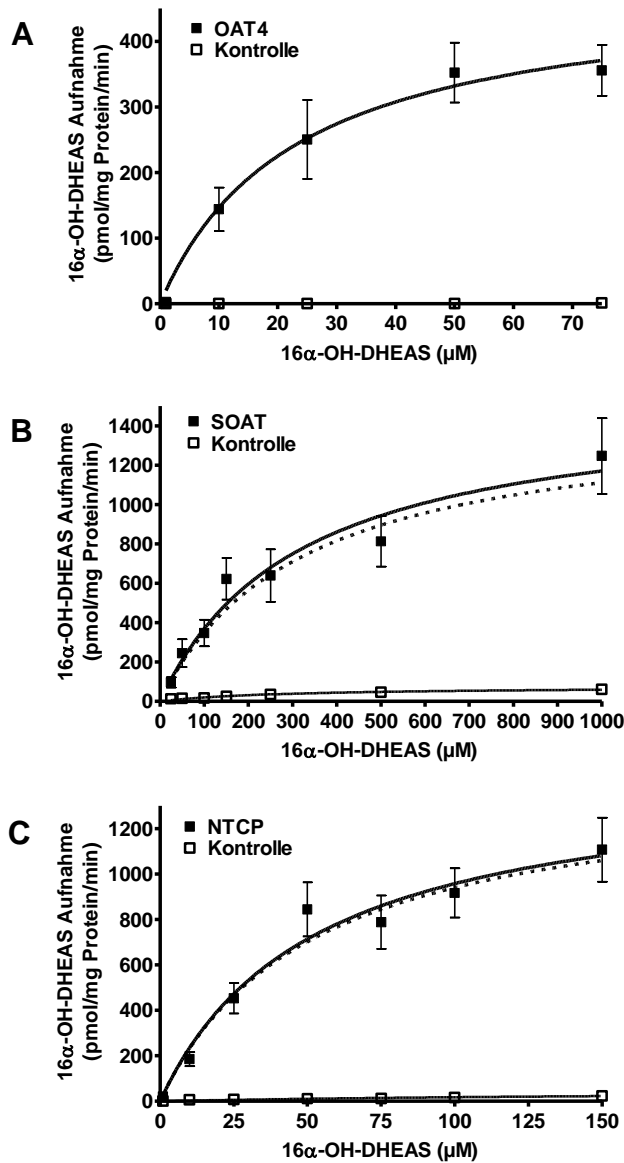


Abb. 4.6: Konzentrationsabhängige Aufnahme von 16α-OH-DHEAS in OAT4-, SOAT- und NTCP-HEK293-Zellen

OAT4-, SOAT- und NTCP-HEK293-Zellen sowie FlpIn-HEK293-Kontrollzellen wurden für 1 min mit steigenden Konzentrationen an 16α-OH-DHEAS inkubiert und das Zelllysate mittels LC-MS-MS analysiert. Um eine Sättigung zu erreichen, wurden OAT4-HEK293-Zellen (A) mit bis zu 75 μM 16α-OH-DHEAS inkubiert, während bei SOAT (B) 1000 μM und bei NTCP (C) 150 μM nötig waren. Die kinetischen Parameter wurden mittels nicht-linearer Regression nach Michaelis-Menten mit dem Programm *GraphPad Prism 4.03* berechnet. Hierfür wurde bei SOAT und NTCP die unspezifische Aufnahme der FlpIn-HEK293-Kontrollzellen (offene Quadrate) von der Aufnahme in die stabil transfizierten Zellen (gefüllte Quadrate) abgezogen, um die transporterspezifische Aufnahme (gestrichelte Linie) zu erhalten. Dies war bei OAT4 nicht nötig, da im eingesetzten Konzentrationsbereich keine unspezifische Aufnahme detektierbar war. Dargestellt sind die MW ± SD von zwei unabhängigen Experimenten, jeweils in Dreifachbestimmung.

Tab. 4.1: Kinetische Parameter der 16α-OH-DHEAS-Aufnahme in OAT4-, SOAT- und NTCP-HEK293-Zellen

Die kinetischen Parameter K_m und V_{max} der konzentrationsabhängigen 16α-OH-DHEAS-Aufnahme wurden mittels nicht-linearer Regression nach Michaelis-Menten mit dem Programm *GraphPad Prism 4.03* ermittelt.

Zelllinie	K_m (μM)	V_{max} (pmol/mg Protein/min)
OAT4-HEK293	23,1 ± 5,1	485,0 ± 39,1
SOAT-HEK293	319,0 ± 59,5	1465,8 ± 118,8
NTCP-HEK293	51,4 ± 9,9	1423,3 ± 109,6

4.2.3 Hemmstudien mit 16 α -OH-DHEAS

Nachdem 16 α -OH-DHEAS als Substrat der Transporter OAT4, SOAT und NTCP identifiziert war, wurde 16 α -OH-DHEAS als Inhibitor eingesetzt, der bei Koinkubation mit einem anderen Substrat (DHEAS) dessen Aufnahme durch die Transporter hemmen sollte. Hierzu wurden OAT4-, SOAT- und NTCP-HEK293-Zellen sowie FlpIn-HEK293-Kontrollzellen mit verschiedenen Konzentrationen an 16 α -OH-DHEAS präinkubiert und anschließend DHEAS (200 nM) hinzugefügt, das ein Substrat aller drei Carrier ist. Diesem war radioaktiv markiertes [3 H]DHEAS zugesetzt, das im Zelllysats mittels Flüssigszintillationsmessung bestimmt wurde. Mit steigenden Konzentrationen an 16 α -OH-DHEAS sank die Aufnahme von [3 H]DHEAS in die Zellen. Die Aufnahme von [3 H]DHEAS wurde in Bezug zu den eingesetzten Konzentrationen an 16 α -OH-DHEAS gesetzt und die IC₅₀-Werte berechnet (Abb. 4.7). Diese geben die mittlere inhibitorische Konzentration an, in diesem Fall also die Konzentration an 16 α -OH-DHEAS, die die Aufnahme von DHEAS um 50 % reduziert. Die IC₅₀-Werte betrugen 27,0 μ M bei OAT4, 303,7 μ M bei SOAT und 138,6 μ M bei NTCP und ähneln damit den ermittelten K_m-Werten von 16 α -OH-DHEAS (Tab. 4.1). Daraus lässt sich folgern, dass eine kompetitive Hemmung der DHEAS-Aufnahme durch 16 α -OH-DHEAS vorlag.

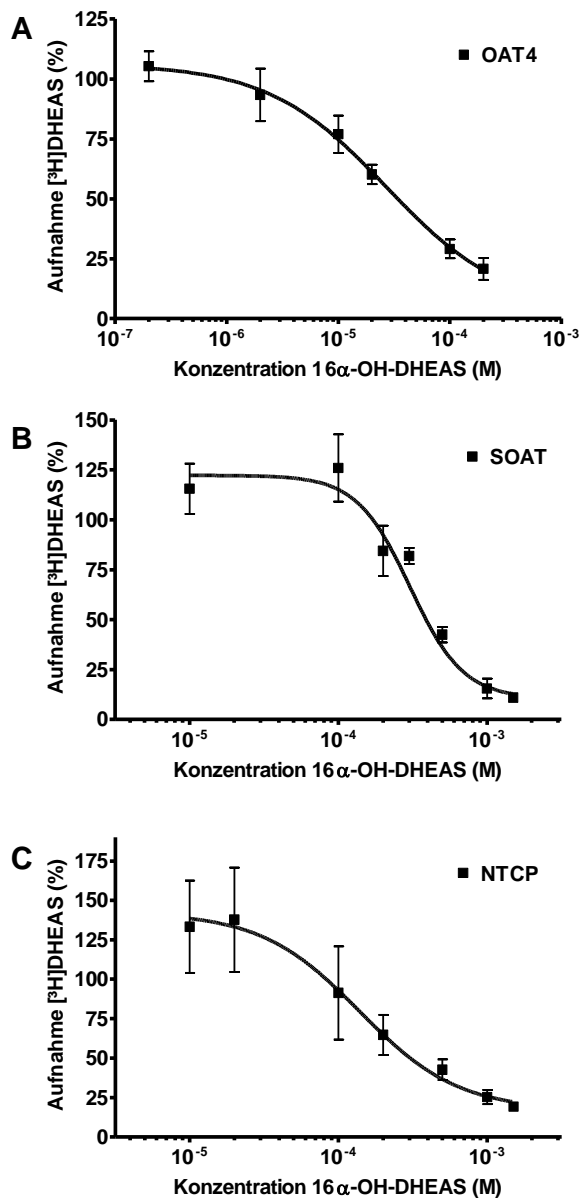


Abb. 4.7: Hemmung der [³H]DHEAS-Aufnahme in OAT4-, SOAT-, und NTCP-HEK293-Zellen durch 16α-OH-DHEAS

Zur Untersuchung von Hemmeffekten von 16α-OH-DHEAS an den Transportern OAT4, SOAT und NTCP wurden stabil transfizierte HEK293-Zellen mit steigenden Konzentrationen an 16α-OH-DHEAS präinkubiert. Die Konzentrationen reichten bei OAT4 (A) von 200 nM bis 200 μM, und bei SOAT (B) und NTCP (C) von 10–1500 μM. Zusätzlich erfolgte die Präinkubation in reinem Transportpuffer ohne Zusatz von 16α-OH-DHEAS. Nach 5 min wurde [³H]DHEAS zugegeben, so dass dessen Konzentration 200 nM betrug. Nach weiteren 5 min wurde die Aufnahme gestoppt und die zellassoziierte Radioaktivität mittels Flüssigszintillationsmessung bestimmt. Zur Auswertung wurde die unspezifische Aufnahme in FlpIn-HEK293-Kontrollzellen von den Aufnahmedaten der stabil transfizierten Zellen abgezogen. Die resultierenden Aufnahmedaten nach Präinkubation in reinem Transportpuffer ohne Zusatz von 16α-OH-DHEAS wurde auf 100 % gesetzt und die Aufnahmeleistung nach Präinkubation mit 16α-OH-DHEAS dazu in Bezug gesetzt. Die Berechnung der IC₅₀-Werte erfolgte mit dem Programm *GraphPad Prism 4.03*. Dargestellt sind die MW ± SD von mindestens zwei unabhängigen Experimenten, jeweils in Vierfachbestimmung.

4.3 JEG-3-Zellen als Plazentamodell - Untersuchung von nativen JEG-3-Zellen

In diesem und den beiden folgenden Unterkapiteln sind die Untersuchungen an JEG-3-Zellen dargestellt. JEG-3-Zellen werden aufgrund ihrer Abstammung von einem Chorionkarzinom und ihrer Fähigkeit zur hCG-, Progesteron- und Östrogensynthese häufig als Modell für Trophoblastenzellen eingesetzt (Kohler et al. 1971; Kohler und Bridson 1971). In dieser Arbeit dienten sie erstmalig der Untersuchung von Steroidsulfattransportern und deren Auswirkung auf die Östrogensynthese. Das vorliegende Unterkapitel beschreibt die durchgeführten Untersuchungen an nativen JEG-3-Zellen. In dem darauffolgenden Unterkapitel 4.4 ist die stabile Transfektion von JEG-3-Zellen mit verschiedenen Steroidsulfattransportern aufgeführt. Die Synthese von Östrogenen in diesen Zelllinien wurde vergleichend gemessen und die Ergebnisse in Unterkapitel 4.5 dargestellt.

4.3.1 Expressionsprofil nativer JEG-3-Zellen

Um einen Überblick über die Genexpression verschiedener Transporter, Enzyme, Rezeptoren und Hormone (humanes Plazentalaktogen, hCG) in den hier eingesetzten JEG-3-Zellen zu erhalten, erfolgte die Charakterisierung der Zellen mittels qRT-PCR. In dieser Arbeit lag besonderer Fokus auf den Steroidsulfattransportern SOAT, OAT4 und OATP2B1, da sie auch in der Plazenta exprimiert werden. Durch stabile Transfektion sollten diese Carrier in JEG-3-Zellen überexprimiert werden und der Einfluss der einzelnen Carrier auf die Östrogensynthese der Plazenta untersucht werden. In der qRT-PCR von nativen JEG-3-Zellen zeigte sich bereits eine deutliche Expression von OAT4, wohingegen SOAT und OATP2B1 kaum exprimiert wurden (Abb. 4.8 A). Des Weiteren zeigte sich eine deutliche Expression des Transporters OATP1A2, der ebenfalls Steroidsulfate transportiert, sowie eine hohe Expression des Schilddrüsenhormontransporters OATP4A1 und des Effluxtransporters *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP). Die Enzyme Sulfatase und Aromatase, die für die Synthese von Östrogenen aus sulfatierten Steroidhormonen notwendig sind, wurden ebenfalls stark exprimiert, wohingegen die Expression der 16 α -Hydroxylasen CYP3A4 und CYP3A7 deutlich geringer ausfiel (Abb. 4.8 B). Beide Enzyme können den Steroidring am Kohlenstoff C16 hydroxylieren und damit 16 α -OH-DHEAS aus DHEAS und 16 α -OH-DHEA aus DHEA bilden. Die 17 α -Hydroxylase/17,20-Lyase (CYP17A1) ist für die Synthese von Steroidhormonen aus Cholesterol notwendig und wurde von JEG-3-Zellen kaum exprimiert. Bei den Hormonen zeigte sich eine hohe Expression des humanen Plazentalaktogens 1 und 2 sowie des humanen Choriongonadotropins hCG (Abb. 4.8. C).

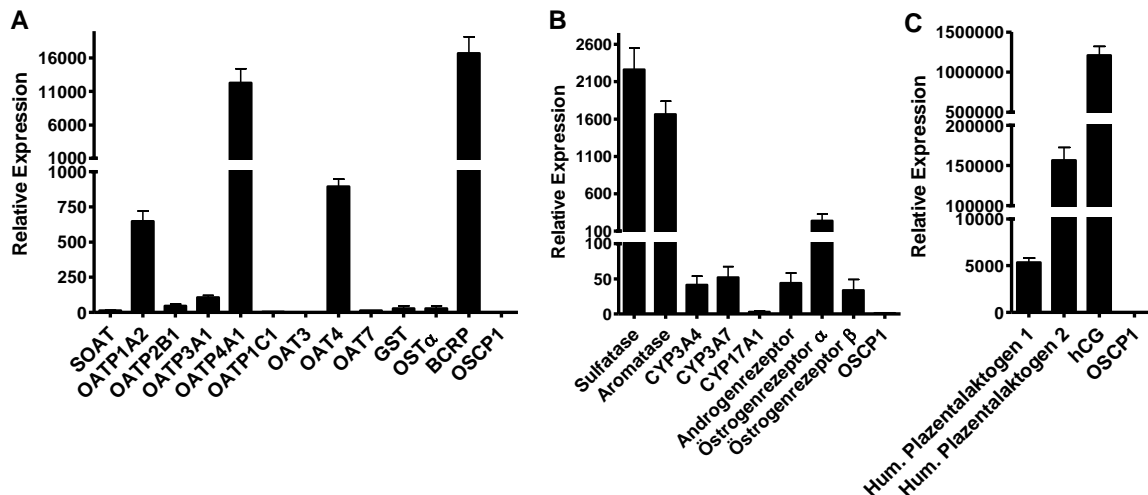


Abb. 4.8: Expressionsprofil nativer JEG-3-Zellen

Zur Untersuchung der Genexpression in JEG-3-Zellen wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR durchgeführt. Untersucht wurde die Expression von Transportern (A), Enzymen und Rezeptoren (B) sowie von Hormonen (C). Die relative Expression wurde mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode bestimmt, bei der β -Aktin als Referenzgen eingesetzt wurde und die Expression von OSCP1 als Kalibrator diente. Die dargestellten Werte zeigen somit eine x-fach höhere Expression gegenüber der Expression von OSCP1 in JEG-3-Zellen an. Dessen Gen wurde am geringsten exprimiert. Die Werte wurden in Dreifachbestimmung ermittelt und die MW \pm SE angegeben.

4.3.2 Aufnahme von sulfatierten Steroiden in nativen JEG-3-Zellen

Native JEG-3-Zellen wurden bei 37 °C mit [3 H]DHEAS und [3 H]E $_1$ S inkubiert und zeigten eine Aufnahme beider Substanzen. Diese war nach 30 min unter natriumhaltigen Bedingungen ca. 1,3-fach erhöht gegenüber der Aufnahme unter natriumfreien Bedingungen (Abb. 4.9). Während die Aufnahme von DHEAS nach 30 min bereits im Bereich der Sättigung lag, befand sich die Aufnahme von E $_1$ S noch in der linearen Steigung und übertraf die Aufnahme von DHEAS. Zur Kontrolle wurde die Messung zusätzlich bei 4 °C durchgeführt, wo sich nur eine sehr geringe Aufnahme zeigte. Die Gesamtaufnahme von DHEAS bei 37 °C war in nativen JEG-3-Zellen gering und lag deutlich unterhalb der Aufnahme von E $_1$ S unter gleichen Bedingungen.

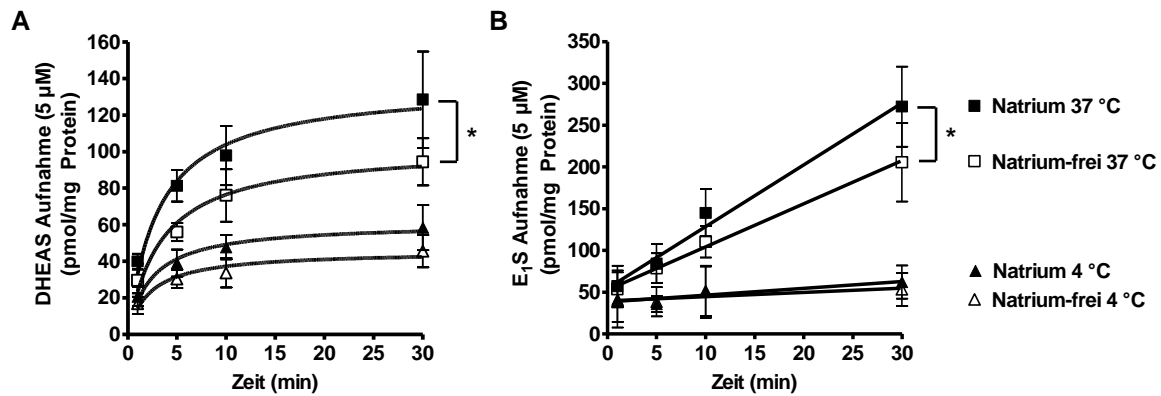


Abb. 4.9: Aufnahme von $[^3\text{H}]\text{DHEAS}$ und $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ in nativen JEG-3-Zellen

Jeweils 5 μM radioaktiv markiertes $[^3\text{H}]\text{DHEAS}$ (A) und $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ (B) wurden in natriumhaltigem (schwarzer Kasten) oder natriumfreiem (offener Kasten) Transportpuffer gelöst und die Zellen bis zu 30 min bei 37 °C oder 4 °C damit inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Substrat abgekippt, die Zellen in eiskaltem PBS gewaschen und anschließend lysiert. Die Detektion der Radioaktivität im Zelllysat erfolgte mittels Flüssigszintillationsmessung. *Unter natriumhaltigen Bedingungen war die Aufnahme signifikant gegenüber der Aufnahme unter natriumfreien Bedingungen erhöht ($p < 0,05$; zweiseitiger ungepaarter t-Test). Die Auswertung erfolgte bei DHEAS mittels nicht-linearer Regression und bei E_1S mittels linearer Regression mit dem Programm *GraphPad Prism 4.03*. Die Werte entsprechen $\text{MW} \pm \text{SD}$ zweier unabhängiger Experimente, jeweils in Dreifachbestimmung.

4.4 Stabile Transfektion von JEG-3-Zellen mit Steroidsulfattransportern

Die Generierung von JEG-3-Zellen, die stabil mit SOAT, OATP2B1 oder OAT4 transfiziert waren, sollte Aufschluss über die Rolle der einzelnen Transporter für die Östrogensynthese in der Plazenta geben. Die stabile Transfektion wurde mit dem Flp-In-System von Invitrogen durchgeführt und gliederte sich in zwei Teilschritte. Zunächst wurde eine FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinie erschaffen. In diese wurden im nachfolgenden Schritt die Transporter stabil eingefügt.

4.4.1 Generierung einer FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinie

Die Herstellung einer FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinie diente dem Zweck, eine sogenannte *FRT site* stabil in das Genom zu integrieren und in einem späteren Schritt die DNA der Transporter SOAT, OATP2B1 oder OAT4 an dieser *FRT site* einzufügen. Somit ist gewährleistet, dass die Transporter-DNA bei den verschiedenen generierten Zelllinien exakt an der gleichen Stelle im Genom integriert ist und die entstehenden SOAT-, OATP2B1- und OAT4-JEG-3-Zelllinien eine vergleichbare Expression der jeweiligen Transporter zeigen (Abb. 3.2). Die Generierung der Wirtszelllinie startete mit der stabilen Transfektion von JEG-3-Zellen mit dem pFRT/*lacZeo*-Vektor, der unter anderem die eben beschriebene *FRT*

site enthält. In einem ersten Versuchsansatz wurde hierbei das intakte Plasmid eingesetzt und die hieraus gewonnenen Zellklone mit Buchstaben (A-E) benannt. In einem zweiten, getrennten Versuchsansatz wurde das pFRT//*lacZeo*-Plasmid, wie von Invitrogen empfohlen, zunächst mit dem Restriktionsenzym *Scal* linearisiert und dieses in der stabilen Transfektion eingesetzt. Die hieraus gewonnenen Zellklone wurden mit Zahlen benannt (4-6; Klon 1-3 gingen während der Selektion verloren). Nachdem mehrere Zellkolonien unter dem Selektionsmedium Zeocin vermehrt wurden, wurde DNA isoliert und die erfolgreiche Integration des pFRT//*lacZeo*-Plasmids mittels PCR überprüft (Abb. 4.10 B). Zusätzlich zur *FRT site* enthält das Plasmid ein *LacZ*-Zeocin-Fusionsgen. Dieses beinhaltet das Zeocin-Resistenzgen, das die Selektion stabil transfizierter Zellen ermöglicht, und das β -Galactosidase-Gen. Es ist von besonderem Interesse, dass das pFRT//*lacZeo*-Plasmid an einer transkriptionell hoch aktiven Stelle des Genoms eingebaut wurde, um später eine ebenfalls hohe Expression des stabil transfizierten Transporters zu gewährleisten. Um dies zu überprüfen, wurde der β -Galactosidase-Assay durchgeführt, bei dem die von den stabil transfizierten Zellen gebildete β -Galactosidase das hinzugefügte Substrat ONPG hydrolytisch spaltet und den gelben Farbstoff ONP hervorbringt. Die Intensität der Gelbfärbung lässt auf die Menge gebildeter β -Galactosidase schließen und somit auf die transkriptionelle Aktivität des Genabschnitts. Es bildeten sich zwei Gruppen von Zellklonen heraus (Abb. 4.10 A). Gruppe 1 enthielt Zelllinien, deren β -Galactosidase-Aktivität um 15 000 nmol hydrolysiertes ONPG/30 min/mg Protein lag und umfasste die Zellklone C, 4 und 6. Gruppe 2 beinhaltete Zellklone, deren Aktivität nur etwa halb so hoch war und ca. 7500 nmol hydrolysiertes ONPG/30 min/mg Protein betrug. Hiervon betroffen waren Klon A, B, E und 5. Die Zellklone aus Gruppe 1 könnten das pFRT//*lacZeo*-Plasmid also an einer transkriptionell aktiveren Stelle im Genom eingebaut haben, verglichen mit Gruppe 2. Eine weitere Möglichkeit auch besteht darin, dass das Plasmid nicht wie gewünscht einmal, sondern zweimal im Genom eingebaut wurde und daher etwa doppelt so viel β -Galactosidase gebildet wurde. Für diese zweite Erklärung spricht die Tatsache, dass die PCR-Banden der Klone aus Gruppe 1 stärker waren als bei Vertretern der Gruppe 2 und somit möglicherweise mehrere Kopien des Zielgens in der DNA vorlagen. Abweichend hiervon hat Klon D eine starke PCR-Bande bei kaum vorhandener β -Galactosidase-Aktivität. Invitrogen empfiehlt die Auswahl eines FlpIn-Wirtszellklons, der das pFRT//*lacZeo*-Plasmid nur einmal eingebaut hat, da die Anwesenheit mehrerer integrierter *FRT sites* die Wahrscheinlichkeit chromosomaler Umordnung und unerwarteter Rekombinations-Ereignisse erhöhe (Life Technologies - Handbuch Flp-In System 2013). Die Anzahl der eingebauten Kopien sollte daher mittels Southern Blot bestimmt werden, so dass nur die β -Galactosidase-Aktivität von Zellklonen verglichen wird, die das Konstrukt einmal eingebaut haben. Die Kopienanzahl wurde daher mit Digoxigenin-markierten Sonden im Southern Blot

versucht zu bestimmen. Die angewandte Methode war allerdings nicht erfolgreich. Als Grundlage für die Auswahl dienten also die oben geschilderten Informationen. Es wurden die Klone 4 und 6 aus Gruppe 1 mit hoher β -Galactosidase-Aktivität ausgewählt, die aufgrund der dicken PCR-Banden aber möglicherweise zweimal das pFRT/*lacZeo* Plasmid eingebaut haben. Daher wurde zusätzlich Klon 5 aus Gruppe 2 mit mittlerer β -Galactosidase-Aktivität ausgewählt. Die aus einem früheren Transfektionsansatz stammenden und mit Buchstaben benannten Klone wurden nicht mehr weiter kultiviert, da sie keine besseren Ergebnisse im β -Galactosidase-Assay erzielten und sie folgende Risiken beinhalteten: Da vor der Transfektion keine Linearisierung des pFRT/*lacZeo*-Plasmids erfolgte, wurde es beim Einbau in das Zellgenom an einer beliebigen Stelle aufgetrennt. Es kann daher nicht gewährleistet werden, dass die für das weitere Vorgehen benötigte ATG-FRT-*lacZ*-*Zeocin*-Kassette bei Einfügen in das Genom intakt geblieben ist. Die Linearisierung des Vektors mit *Scal* beim zweiten Transfektionsansatz gewährleistet hingegen, dass die Schnittstelle außerhalb der *FRT site* liegt.

Als Positivkontrolle in der PCR und im β -Galactosidase-Assay dienten die kommerziell erhältlichen FlpIn-HEK293-Zellen, die die FlpIn-Wirtszelllinie von HEK293-Zellen darstellen. Die β -Galactosidase-Aktivität war bei ihnen um ein Vielfaches (4-10-fach) gegenüber den selbst hergestellten FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinien erhöht.

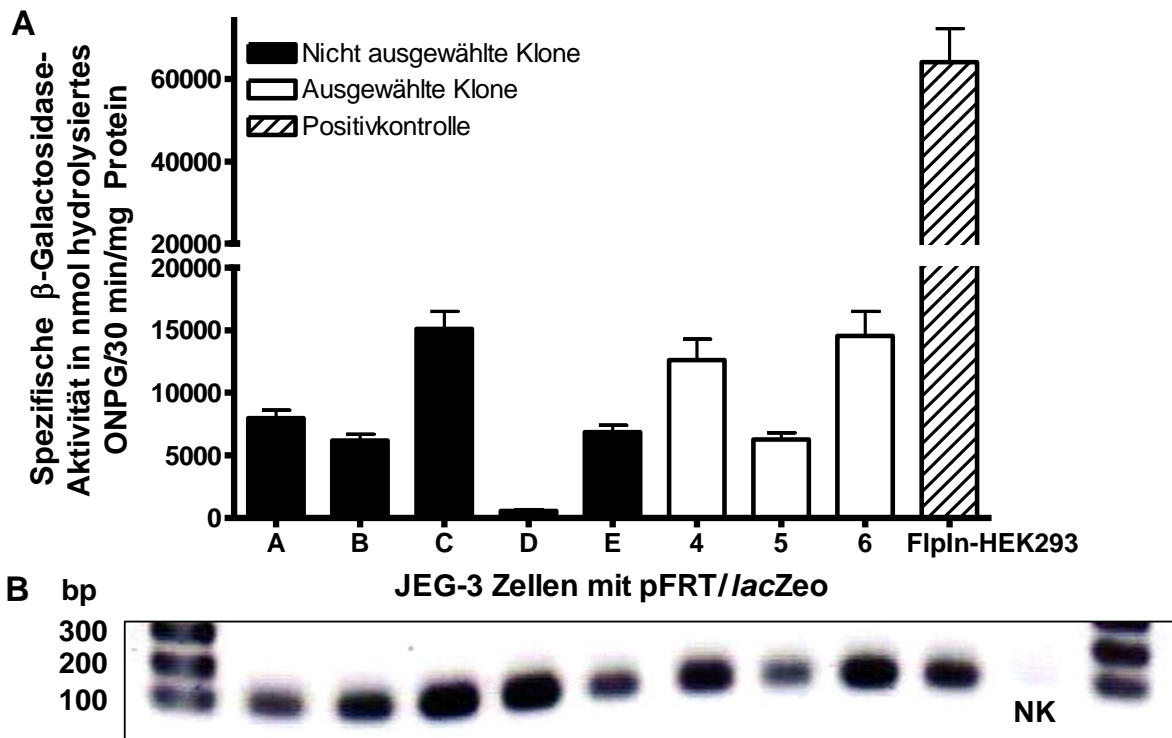


Abb. 4.10: Überprüfung der FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinien

(A) β -Galactosidase-Assay: Die selektionierten FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinien wurden lysiert und mit dem β -Galactosidase Substrat ONPG versetzt. Dieses wurde in Galactose und den gelben Farbstoff ONP gespalten, dessen Extinktion bei 415 nm im *Microplate Reader* photometrisch bestimmt wurde. Es wurden jeweils 5 μ l, 10 μ l und 30 μ l Zelllysat eingesetzt und mit der gleichen Menge ONPG versetzt, so dass die Extinktion in Proben mit 5 μ l Zelllysat am geringsten und mit 30 μ l Zelllysat am höchsten war, und sich eine proportionale Beziehung zwischen den verschiedenen Lysatkonzentrationen ergab. Von den erhaltenen Werten wurde die Extinktion nativer JEG-3-Zellen abgezogen. Die dargestellten Werte sind die auf die Proteinmenge bezogenen spezifischen β -Galactosidase-Aktivitäten aus den drei Konzentrationsansätzen. Zellklone A-E (schwarze Balken) stammen aus einem früheren Ansatz der stabilen Transfektion und wurden nach diesem Test nicht mehr weiter kultiviert. Klone 4-6 (weiße Balken) wurden für die weitere stabile Transfektion ausgewählt.

(B) PCR auf den pFRT/lacZeo-Vektor: Für jeden Zellklon wurden 0,025 μ g DNA in der PCR eingesetzt. Als Negativkontrolle (NK) wurde ddH₂O anstelle der DNA eingesetzt.

4.4.2 Generierung von stabil mit Transportern transfizierten JEG-3-Zelllinien

Die FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinien 4, 5 und 6 wurden jeweils stabil mit den Transportern SOAT, OAT4 und OATP2B1 transfiziert und mit Hygromycin selektioniert. Als Screening wurden die entstandenen Klone in einer Transportmessung überprüft, wobei sich für die Abkömmlinge der FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinie 5 die höchsten Aufnahmen ergaben, so dass diese zukünftig verwandt wurden. Die FlpIn-JEG-3 Wirtszelllinie 5 wurde auf den Namen JEG-3-FRT getauft. Bei der stabilen Transfektion mit Transporter-DNA ergaben sich für die einzelnen Transporter mehrere Zellklone, wobei auf Basis des genannten Transportscreenings und qRT-PCRs einzelne Klone für die späteren Versuche ausgewählt wurden. Für SOAT waren dies zwei Klone, benannt SOAT-JEG-3 #1 und SOAT-JEG-3 #2. Für die anderen

Transporter waren es jeweils ein Zellklon, benannt OATP2B1-JEG-3 und OAT4-JEG-3 (Abb. 4.11).

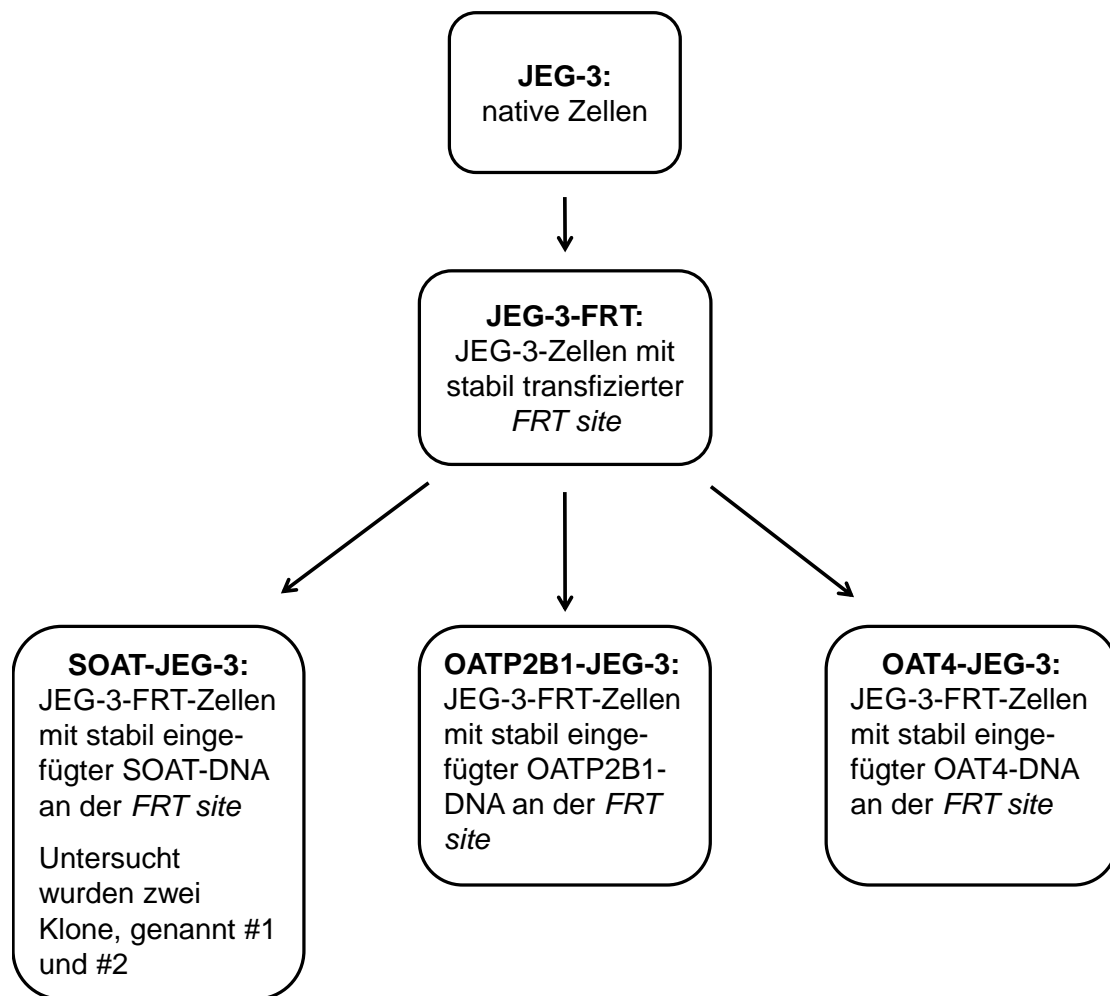


Abb. 4.11: Übersicht und Nomenklatur über die verwendeten JEG-3-Zelllinien

Dargestellt sind die in den folgenden Versuchen eingesetzten JEG-3-Zelllinien, sowie deren Beziehung zueinander. Bei Messungen mit stabil transfizierten SOAT-, OATP2B1- und OAT4-JEG-3-Zellen wurde deren Vorgängerzelllinie JEG-3-FRT als Kontrollzelllinie eingesetzt.

Bei der Überprüfung der Genexpression mittels qRT-PCR ergab sich für SOAT-JEG-3 #1 und OATP2B1-JEG-3 eine ähnlich hohe Expression der jeweiligen Transporter, während die SOAT-Expression bei SOAT-JEG-3 #2 nur 1/4 der Expression von Klon #1 betrug (Abb. 4.12). Bei OAT4, der bereits in nativen JEG-3-Zellen exprimiert wird, zeigte sich eine deutlich erhöhte Expression in JEG-3-FRT-Zellen, wohingegen die Expression in den stabil transfizierten OAT4-JEG-3-Zellen niedriger war. Hier ist exemplarisch einer der getesteten Klone dargestellt (Abb. 4.12). Dieses Phänomen deckt sich auch mit der Beobachtung, dass die OAT4-JEG-3-Zellen während des Selektionsprozesses mit Hygromycin deutlich sensibler waren als SOAT- und OATP2B1-JEG-3-Zellen. Die Überexpression von OAT4 war demnach nicht erfolgreich.

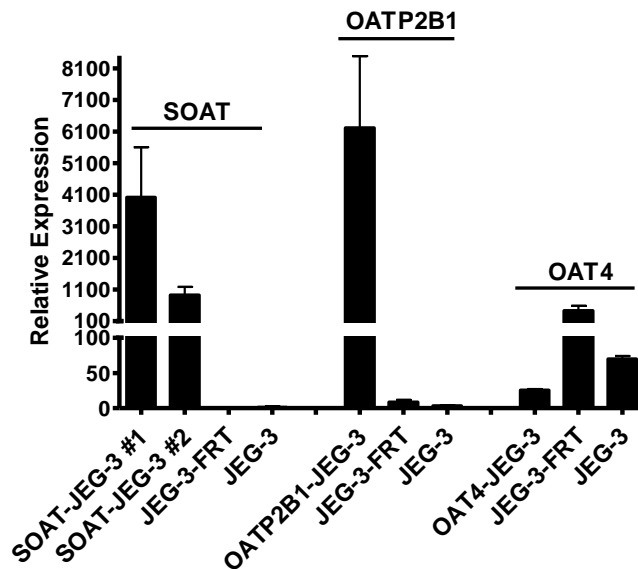


Abb. 4.12: Genexpression stabil transfizierter SOAT-, OATP2B1- und OAT4-JEG-3-Zellen

Aus SOAT-, OATP2B1- und OAT4-JEG-3-Zellen sowie aus JEG-3-FRT- und nativen JEG-3-Zellen wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und in der qRT-PCR auf die jeweiligen Transporter überprüft. Die Zelllinien JEG-3-FRT und JEG-3 dienten als Kontrolle für die Frage, ob in den stabil mit Transportern transfizierten Zelllinien tatsächlich eine erhöhte Expression von SOAT, OATP2B1 bzw. OAT4 vorlag. Die relative Expression wurde mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode bestimmt, bei der β -Aktin als endogene Kontrolle eingesetzt wurde und die Expression von SOAT in JEG-3-FRT-Zellen als Kalibrator diente. Die dargestellten Werte zeigen somit eine x-fach höhere Expression als die Expression von SOAT in JEG-3-FRT-Zellen an. Die Werte wurden in Dreifachbestimmung ermittelt und die MW \pm SE angegeben.

SOAT-JEG-3-Zellen wurden sowohl im Western Blot als auch in der Immunfluoreszenz auf das SOAT-Protein untersucht. Im Western Blot wurde das Protein von SOAT-JEG-3 #1 in Verbindung mit dem Antikörper SOAT₃₁₁₋₃₇₇ eingesetzt, der das Protein im Bereich von 54, 57 und 59 kDa nachwies (Abb. 4.13). Damit war die Transfektion von SOAT in JEG-3-Zellen erfolgreich. In JEG-3-FRT-Kontrollzellen wurden hingegen keine SOAT-spezifischen Banden detektiert. Die SOAT-Bande von 54 kDa lag auf Höhe des oberen Bereichs der Positivkontrolle mit SOAT-HEK293-Zellen, in denen das Protein im Bereich von 38 und 45-54 kDa nachweisbar war.

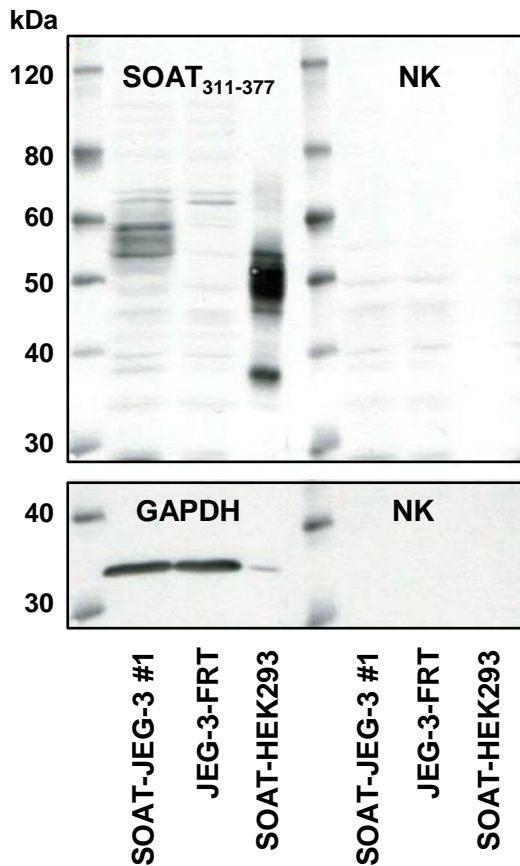


Abb. 4.13: Western Blot von stabil trans-fizierten SOAT-JEG-3-Zellen

Aus SOAT-JEG-3 #1 und JEG-3-FRT-Kontrollzellen wurde Protein isoliert und jeweils 60 µg im Western Blot eingesetzt. SOAT-HEK293-Zellen dienen als Positivkontrolle und wurden in einer Menge von 1,5 µg eingesetzt. Der SOAT₃₁₁₋₃₇₇-Antikörper wurde 1:100 verdünnt auf die Membran gegeben und mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Als Negativkontrolle (NK) erfolgte die Inkubation einer Hälfte der Membran, auf der ebenfalls die Proteinproben aufgetragen waren, ohne Primärantikörper. Nach Detektion des SOAT-Proteins wurde gebundener Antikörper durch Strippen entfernt und die Membran mit GAPDH-Antikörper 1:25 000 inkubiert, um zu überprüfen, ob gleiche Proteinmengen bei SOAT-JEG-3- und JEG-3-FRT-Zellen eingesetzt wurden.

In der Immunfluoreszenz wurde unter Einsatz des Antikörpers SLC10A6 C-13 eine Färbung der Zellgrenzen sowie des Zytoplasmas beobachtet, die allerdings in SOAT-JEG-3 #1 und #2 sowie in JEG-3-FRT-Kontrollzellen ähnlich intensiv ausfiel (Abb. 4.14). Somit ließ sich lediglich die basal vorhandene SOAT-Expression zeigen, eine quantitative Aussage über die SOAT-Expression in stabil transfizierten SOAT-JEG-3-Zellen konnte nicht getroffen werden. Um die Eignung des Antikörpers zu überprüfen, wurden als Positivkontrolle SOAT-HEK293-Zellen eingesetzt, in denen sich eine deutliche Färbung ergab, die in der Kontrollzelllinie FlpIn-HEK293 fehlte. Bei Vergleich der Belichtungszeiten, die zur Visualisierung der Grünfluoreszenz eingesetzt wurden, fällt auf, dass diese für SOAT-JEG-3- und JEG-3-FRT-Zellen fast 5-fach länger waren als bei SOAT-HEK293-Zellen. Dies deutet darauf hin, dass die SOAT-Expression in SOAT-HEK293-Zellen deutlich höher ist.

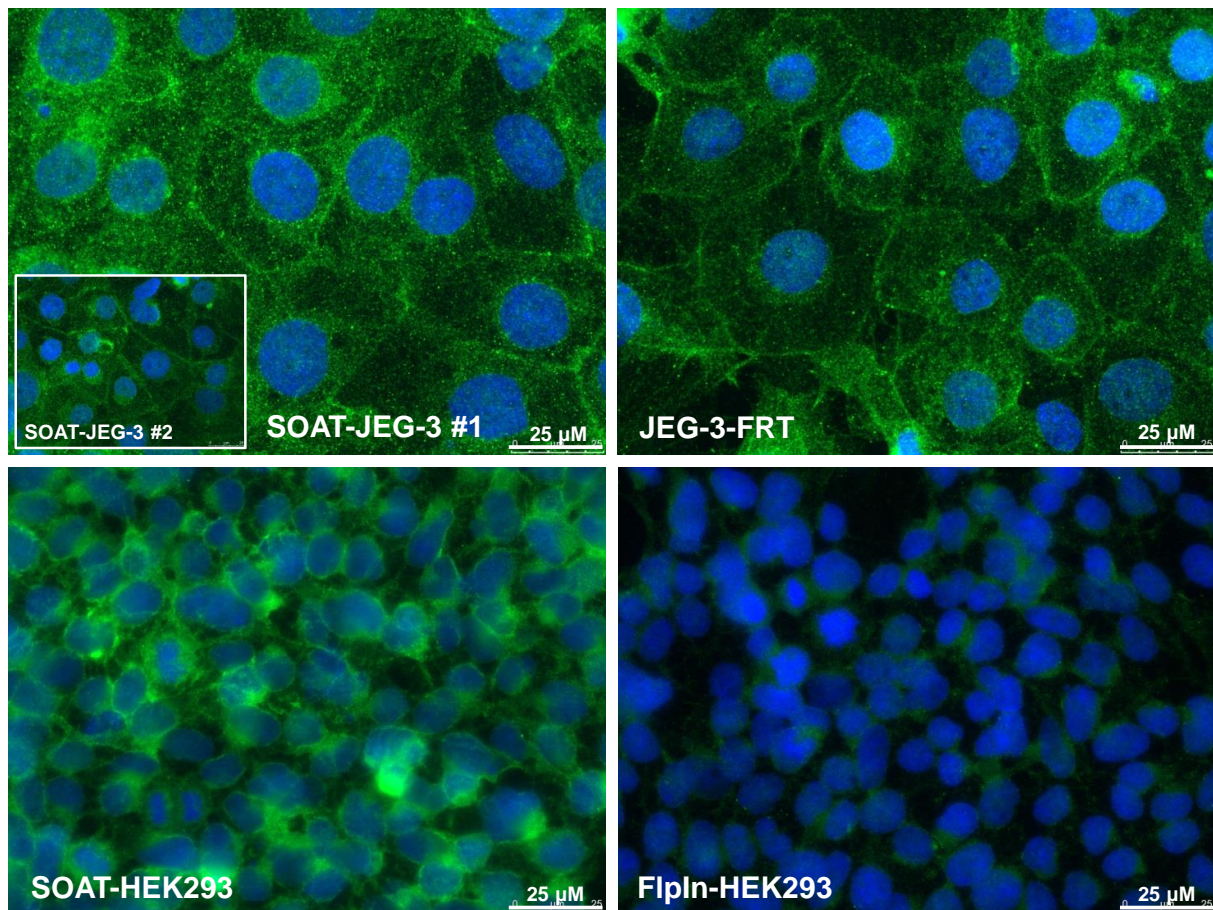


Abb. 4.14: Immunfluoreszenz von stabil transfizierten SOAT-JEG-3-Zellen

SOAT-JEG-3 #1 und #2 sowie JEG-3-FRT-Zellen wurden mit PFA fixiert und mit dem SLC10A6 C-13-Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper (grün fluoreszierend), der im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht wurde. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Als Positivkontrolle dienten SOAT-HEK293-Zellen und als Negativkontrolle deren Wirtszelllinie FlpIn-HEK293. Die Belichtungszeit für die Visualisierung der grünen Fluoreszenz betrug bei SOAT-JEG-3- und JEG-3-FRT-Zellen 373 ms, bei SOAT-HEK293 und FlpIn-HEK293 betrug sie lediglich 80 ms.

4.4.3 Aufnahmemessungen an stabil mit Transportern transfizierten JEG-3-Zelllinien

Die stabil transfizierten Zelllinien SOAT-JEG-3 #1 und #2 sowie OATP2B1-JEG-3 wurden für 10 min mit [3 H]DHEAS (Abb. 4.15 A) und [3 H]E₁S (Abb. 4.15 B) inkubiert und die Aufnahme mit der von JEG-3-FRT-Kontrollzellen verglichen. Wie schon bei den nativen JEG-3-Zellen (Kapitel 4.3.2) zeigten die Zellen eine Aufnahme dieser Substrate, die unter natriumfreien Bedingungen vermindert war. Unter Anwesenheit von Natrium war die Aufnahme von DHEAS und E₁S in beiden stabil transfizierten SOAT-JEG-3-Zelllinien gegenüber den Kontrollzellen ca. 1,3-fach erhöht, während die Aufnahmeleistung unter natriumfreien Bedingungen auf Niveau der Kontrollzellen blieb. In stabil transfizierten OATP2B1-JEG-3-Zellen stieg die Aufnahme von DHEAS sowohl unter natriumhaltigen als auch natriumfreien Bedingungen auf das 1,2-fache gegenüber den Kontrollzellen an, von E₁S auf das 2,3-fache.

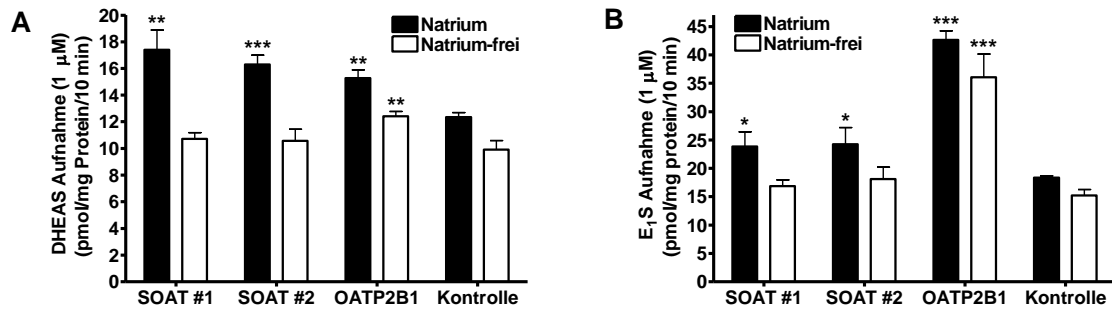


Abb. 4.15: Aufnahme von $[^3\text{H}]\text{DHEAS}$ und $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ in stabil transfizierten SOAT- und OATP2B1-JEG-3-Zellen

Die Aufnahme von 1 µM $[^3\text{H}]\text{DHEAS}$ (A) und 1 µM $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ (B) wurde über 10 min vergleichend in SOAT- und OATP2B1-JEG-3-Zellen sowie in JEG-3-FRT-Kontrollzellen gemessen, die Zellen lysiert und die im Zelllysat vorhandene Radioaktivität mittels Flüssigszintillationsmessung bestimmt. Die Messung fand sowohl in natriumhaltigem (schwarze Balken) als auch natriumfreiem Transportpuffer (weiße Balken) statt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; statistisch signifikant höhere Aufnahme als in JEG-3-FRT-Zellen (Kontrolle) unter natriumhaltigen bzw. natriumfreien Bedingungen (zweiseitiger ungepaarter t-Test). Dargestellt ist eine repräsentative Messung aus zwei unabhängigen Experimenten, jeweils in Dreifachbestimmung. Die Werte entsprechen MW \pm SD.

Ein Screening der OAT4-JEG-3-Klone zeigte keine erhöhte Aufnahme von DHEAS (Abb. 4.16 A) oder E₁S (Abb. 4.16 B) gegenüber JEG-3-FRT-Zellen (Kontrolle), so dass exemplarisch ein Klon dargestellt ist. Da sich auch in der qRT-PCR keine erhöhte Genexpression gegenüber den Kontrollzellen zeigen ließ, wurden diese Zelllinien nicht mehr weiter untersucht.

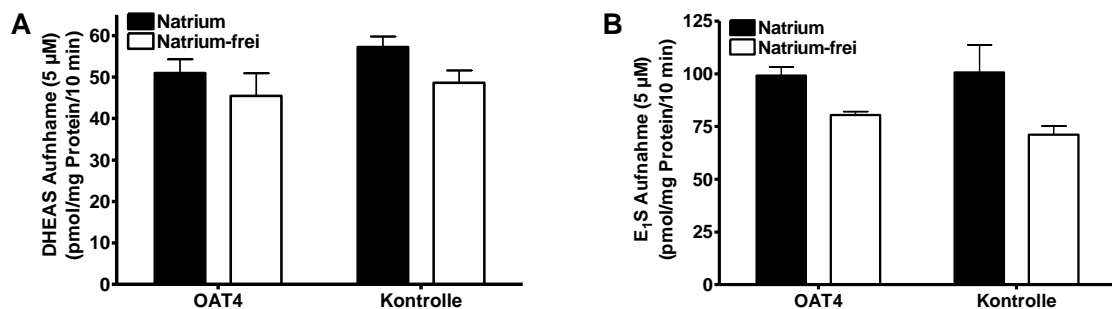


Abb. 4.16: Aufnahme von $[^3\text{H}]\text{DHEAS}$ und $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ in stabil transfizierten OAT4-JEG-3-Zellen

Verschiedene OAT4-JEG-3-Zellklone wurden mit 5 µM $[^3\text{H}]\text{DHEAS}$ (A) und 5 µM $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ (B) über 10 min unter natriumhaltigen (schwarze Balken) und natriumfreien (weiße Balken) Bedingungen inkubiert und die Aufnahme mit der von JEG-3-FRT-Kontrollzellen verglichen. Dargestellt ist ein repräsentativer Klon, der in diesem Screening getestet wurde. Die im Zelllysat vorhandene Radioaktivität wurde mittels Flüssigszintillationsmessung bestimmt. Die Messung wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt und die Werte entsprechen MW \pm SD.

4.5 Metabolismusmessungen an JEG-3-Zellen

JEG-3-Zellen können aufgrund ihrer Enzymausstattung Östrogenvorstufen zu Östrogenen metabolisieren (Kohler et al. 1971; Samson et al. 2009). Um die Rolle von verschiedenen Steroidsulfattransportern für die plazentare Östrogensynthese zu untersuchen, wurden die Transporter stabil in JEG-3-Zellen transfiziert (Kapitel 4.4) und die Östrogensynthese dieser Zelllinien gemessen. Die Zellen wurden hierzu mit sulfatierten Steroiden als Östrogenvorstufen inkubiert, die in serumfreiem Zellmedium (Ham's F12) gelöst waren, um jeglichen Einfluss der im FKS enthaltenen Steroidhormone auszuschließen. Nach 24 h wurde das Medium entnommen und die darin enthaltenen Steroidhormone mittels LC-MS-MS bestimmt.

4.5.1 Metabolismus von nativen JEG-3-Zellen

Native JEG-3-Zellen wurden für 24 h mit 5 μ M DHEAS, DHEA, oder 16 α -OH-DHEAS im CO₂-Brutschrank inkubiert. Die in dieser Zeit gebildeten Steroidhormone sind in Abb. 4.17 dargestellt.

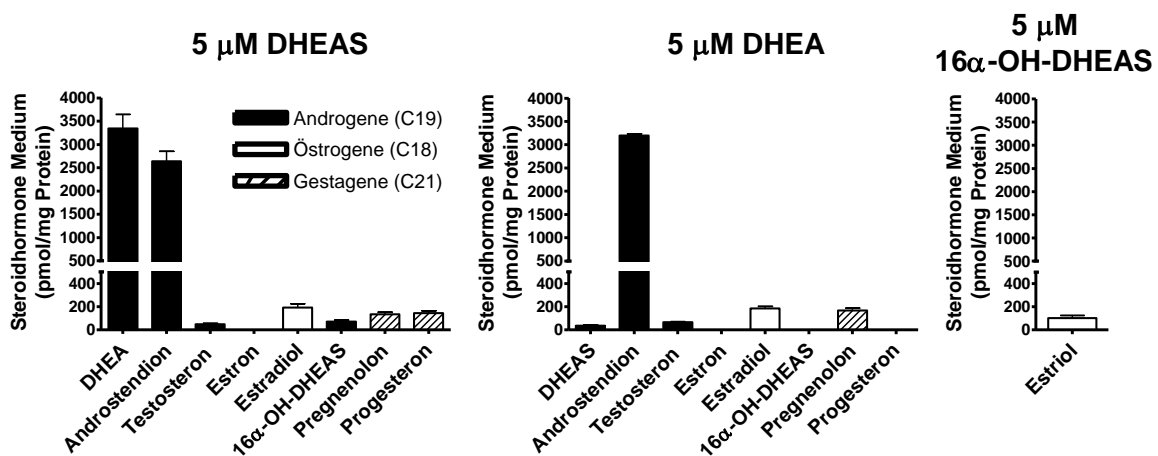


Abb. 4.17: Metabolismus von DHEAS, DHEA und 16 α -OH-DHEAS in nativen JEG-3-Zellen

Dargestellt sind die von den Zellen nach 24 h gebildeten Androgene (schwarze Balken), Östrogene (weiße Balken) und Gestagene (schraffierte Balken). Zusätzlich wurde eine Synthese von 16 α -OH-DHEA aus DHEAS, DHEA und 16 α -OH-DHEAS detektiert, die mit der angewandten Methode allerdings nicht genau quantifizierbar war und daher nicht im Balkendiagramm dargestellt ist. Vorbereitend zur Messung wurden die Zellen drei Tage vor Versuchsbeginn mit Medium versorgt, dessen FKS durch DCC-FKS ersetzt war. Diesem sind die natürlich enthaltenen Steroidhormone entzogen. Zum Versuchsstart wurden die Zellen mit 5 μ M DHEAS, DHEA oder 16 α -OH-DHEAS im CO₂-Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Substanzen waren in Ham's F12-Medium ohne Zusatz von FKS gelöst. Nach 24 h wurde das Medium entnommen und die enthaltenen Steroidhormone mittels LC-MS-MS bestimmt. Die Messung wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt und die Werte entsprechen MW \pm SD.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Nach Inkubation mit DHEAS bzw. DHEA wurden Estradiol sowie die auf dem Weg entstehenden Zwischenprodukte Androstendion und Testosteron gebildet. Bei Inkubation mit DHEAS entstand zusätzlich DHEA. Estron hingegen wurde nicht detektiert.
2. Sowohl nach DHEAS- als auch nach DHEA-Inkubation kam es zu einem Anstieg von Androstendion. Die gebildete Estradiolmenge war nach DHEAS-Inkubation genauso hoch wie nach DHEA-Inkubation.
3. Die Zellen besaßen die Fähigkeit, den Steroidring am Kohlenstoff C16 zu hydroxylieren. So entstanden nach Inkubation mit DHEAS sowohl 16 α -OH-DHEAS als auch 16 α -OH-DHEA, während nach Inkubation mit DHEA nur 16 α -OH-DHEA entstand. 16 α -OH-DHEA ist allerdings nicht im Balkendiagramm dargestellt, da eine Methode zur genauen Quantifizierung dieser Substanz mit LC-MS-MS zunächst hätte entwickelt werden müssen.
4. Bei Inkubation der Zellen mit DHEAS metabolisierten die Zellen $7,8 \pm 1,4$ nmol DHEAS/mg Protein in 24 h in Androgene und Östrogene (MW \pm SD). Bei DHEA waren es $15,4 \pm 3,1$ nmol DHEA/mg Protein in 24 h.
5. JEG-3-Zellen bildeten Pregnenolon und Progesteron. Diese Synthese findet unabhängig von zugesetzten Vorläufermolekülen wie DHEAS und DHEA in JEG-3-Zellen statt (Kohler et al. 1971). Auffällig ist, dass nach Inkubation mit DHEA die Progesteronsynthese aus Pregnenolon gehemmt war, während nach Inkubation mit DHEAS beide Hormone gebildet wurden. Bei der Inkubation mit 16 α -OH-DHEAS erfolgte keine Quantifizierung von Pregnenolon und Progesteron, weshalb diese Hormone nicht im Balkendiagramm aufgeführt sind.
6. Nach Inkubation mit 16 α -OH-DHEAS waren die Zellen in der Lage, dieses zu 16 α -OH-DHEA zu desulfatieren und in Estriol umzuwandeln. Auch hier ist 16 α -OH-DHEA aufgrund der mangelnden Quantifizierbarkeit nicht im Balkendiagramm dargestellt. Es wurden $4,2 \pm 2,0$ nmol 16 α -OH-DHEAS/mg Protein in 24 h zu 16 α -OH-DHEA und Estriol metabolisiert.

4.5.2 Metabolismus von stabil mit Transportern transfizierten JEG-3-Zelllinien

Die stabile Transfektion von JEG-3-Zellen mit Steroidsulfattransportern wurde mit dem Ziel durchgeführt, die Rolle der einzelnen Transporter für die plazentare Östrogensynthese zu beurteilen. SOAT- und OATP2B1-JEG-3-Zellen sowie JEG-3-FRT-Kontrollzellen wurden über 24 h mit 5 μ M DHEAS, DHEA oder E₁S inkubiert und die Menge synthetisierter Steroide im Medium bestimmt. Folgende Annahme lag dieser Versuchsdurchführung zugrunde: SOAT- und OATP2B1-JEG-3 Zellen sollten aufgrund ihrer Transportaktivität für DHEAS und E₁S in der Lage sein, höhere Mengen dieser Substrate aufzunehmen als JEG-3-FRT-Zellen und somit mehr Zwischenprodukte der Estradiolsynthese sowie Estradiol bilden können. Die

Inkubation mit der unsulfatierten Form DHEA, die unabhängig von Transportern in die Zellen diffundieren kann, sollte hingegen kein verändertes Steroidprofil ergeben. Die gebildeten Metabolite nach Inkubation der Zellen mit DHEAS und DHEA sind in Abb. 4.18 dargestellt.

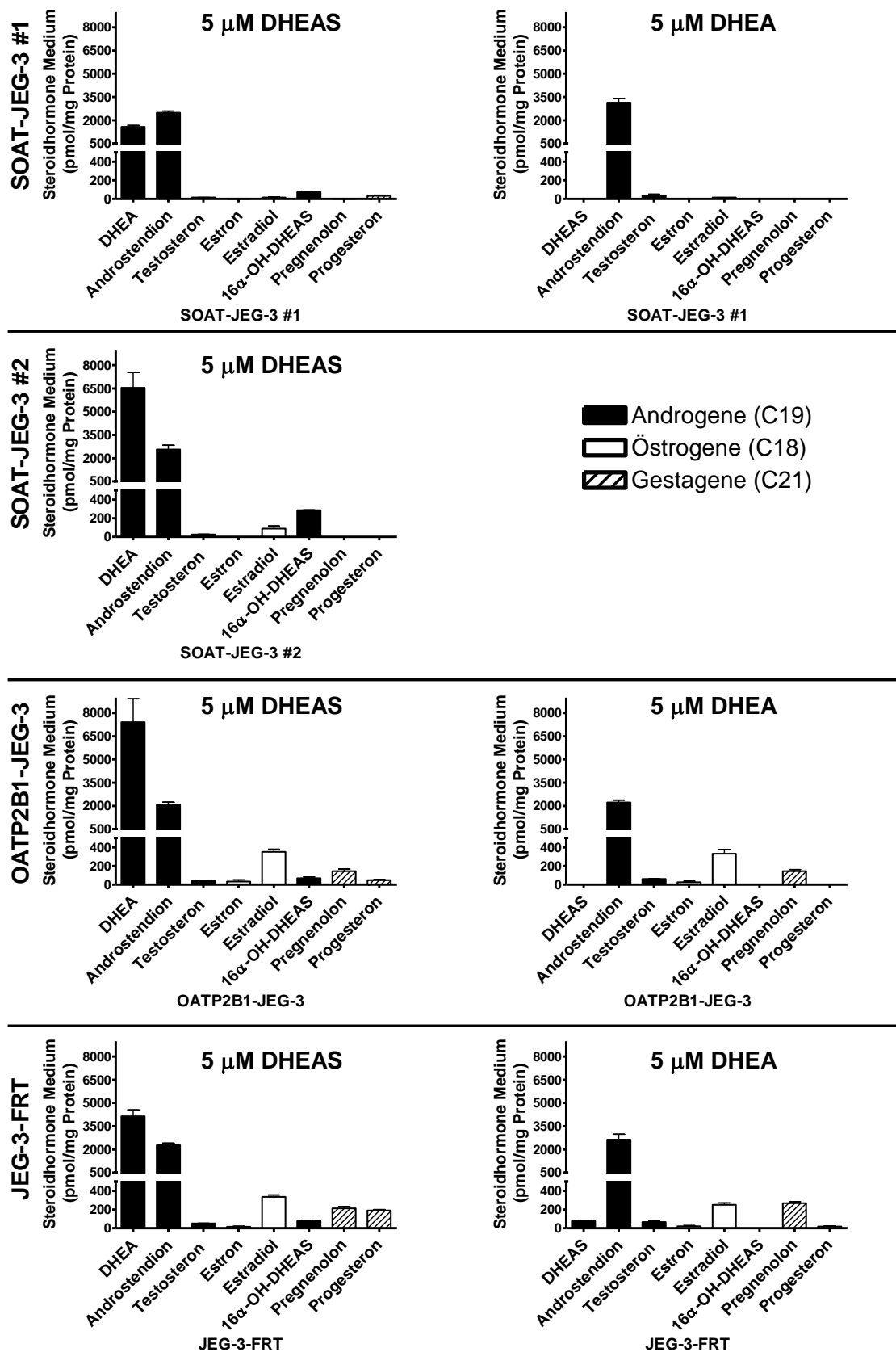


Abb. 4.18: Metabolismus von DHEAS und DHEA in SOAT-, OATP2B1-JEG-3- und JEG-3-FRT-Zellen

Stabil transfizierte SOAT- und OATP2B1-JEG-3-Zellen sowie deren untransfizierte Kontrollzelllinie JEG-3-FRT wurden über 24 h im Brutschrank mit 5 µM DHEAS (links) oder DHEA (rechts) inkubiert. Das Medium wurde entnommen und die Menge an Steroidhormonen mittels LC-MS-MS ermittelt. Dargestellt sind die von den Zellen gebildeten Androgene (schwarze Balken), Östrogene (weiße Balken) und Gestagene (schraffierte Balken). Nicht dargestellt ist die von allen Zelllinien durchgeführte Synthese von 16α-OH-DHEA aus DHEAS und DHEA, da eine genaue Quantifizierung dieser Substanz mit LC-MS-MS zunächst hätte etabliert werden müssen. SOAT-JEG-3 #2 wurde in einer späteren Messung untersucht, in der nur mit DHEAS und nicht mit DHEA inkubiert wurde. Daher gibt es keine Darstellung des Metabolismus von SOAT-JEG-3 #2 mit DHEA. Bei der dargestellten Messung von SOAT-JEG-3 #1, OATP2B1-JEG-3 und JEG-3-FRT mit DHEAS handelt es sich um eine repräsentative Messung zweier unabhängiger Experimente in Dreifachbestimmung. Die Versuche mit DHEA und die Messung mit SOAT-JEG-3 #2 erfolgte einmal in Dreifachbestimmung. Dargestellt sind die MW ± SD.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Die DHEA-Synthese aus DHEAS war bei den Zellen SOAT-JEG-3 #2 und OATP2B1-JEG-3 etwa doppelt so hoch wie bei der Kontrolle JEG-3-FRT. Dies deutet auf eine erhöhte Aufnahme von DHEAS hin, das durch die Sulfatase zu DHEA desulfatiert wird. Ein Vergleich des nach 24 h metabolisierten Anteils von DHEAS zeigt zudem, dass diese beiden Zelllinien mehr DHEAS umgesetzt haben als JEG-3-FRT-Zellen, wobei sich für OATP2B1-Zellen lediglich eine Tendenz ergab, die nicht statistisch signifikant war (Tab. 4.2). Bei Inkubation mit der unsulfatierten Form DHEA hingegen lag die Umsetzung von DHEA bei allen Zelllinien in einem ähnlichen Bereich, zwischen 12,4 und 16,8 nmol/mg Protein.
2. Trotz der erhöhten DHEAS-Aufnahme in SOAT-JEG-3 #2- und OATP2B1-JEG-3-Zellen wurde nicht vermehrt Androstendion gebildet. Dies deutet auf eine gesättigte Syntheserate hin.
3. OATP2B1-JEG-3-Zellen bildeten trotz höherer DHEAS-Aufnahme genauso viel Estradiol wie JEG-3-FRT-Zellen. Auch hier war also die Syntheserate gesättigt.
4. Bei SOAT-JEG-3 #1 war die Estradiolsynthese sowohl nach DHEAS- als auch nach DHEA-Inkubation stark vermindert gegenüber den Kontrollzellen. Wegen des unerwarteten Ergebnisses wurde ein zweiter SOAT-Klon, SOAT-JEG-3 #2 getestet, der ebenfalls eine verminderte Estradiolsynthese nach DHEAS-Inkubation zeigte, die allerdings trotzdem höher war als bei Klon #1.
5. Bei SOAT- und OATP2B1-JEG-3-Zellen war sowohl die Pregnenolon- als auch die Progesteronsynthese vermindert gegenüber JEG-3-FRT-Zellen. Dies gibt einen Hinweis auf eine Beeinträchtigung der benötigten Enzyme in den stabil mit Transportern transfizierten Zellen.

6. Die stabil transfizierten Zellen nahmen wie die nativen JEG-3-Zellen eine Hydroxylierung am Kohlenstoff C16 vor. Auch hier wurde 16 α -OH-DHEA nicht im Balkendiagramm dargestellt, weil eine genaue Quantifizierung mit LC-MS-MS nicht möglich war.

Tab. 4.2: Metabolisierung von DHEAS durch stabil transfizierte SOAT- und OATP2B1-JEG-3-Zellen sowie JEG-3-FRT-Zellen

Aufgelistet ist der Verbrauch von DHEAS durch SOAT-, OATP2B1-JEG-3- und JEG-3-FRT-Zellen nach 24 h. Hierzu wurde die Konzentration von DHEAS, die am Ende der Messung im Zellmedium enthalten war, von der anfangs eingesetzten Konzentration (5 μ M) abgezogen und auf den Proteingehalt in den Wells bezogen. Der Umsatz von DHEAS in SOAT- und OATP2B1-JEG-3-Zellen wurde mit dem Umsatz in den Kontrollzellen JEG-3-FRT verglichen. * p<0,01: statistisch signifikant erhöhter Umsatz gegenüber JEG-3-FRT; # p<0,01: signifikant niedrigerer Umsatz im Vergleich zu JEG-3-FRT; ns p>0,05: nicht signifikant; zweiseitiger ungepaarter t-Test. Die fett hervorgehobenen Messungen sind in Abb. 4.18 dargestellt. Messung 1 wurde ausgewählt, um ein Vergleich mit der parallel durchgeführten Messung mit DHEA zu ermöglichen.

Menge des nach 24 h umgesetzten DHEAS in nmol/mg Protein (MW \pm SD)		
Zelllinie	Messung 1	Messung 2
SOAT-JEG-3 #1	4,0 \pm 0,8	5,7 \pm 0,6
SOAT-JEG-3 #2	-	9,6 \pm 1,3
OATP2B1-JEG-3	11,5 \pm 0,9	5,9 \pm 0,9
JEG-3-FRT	9,1 \pm 1,7	3,3 \pm 1,4

Um eine Ansammlung von sulfatierten Steroiden in den Zellen auszuschließen, welche die Zellen aufgrund ihrer Hydrophilie nicht durch passive Diffusion verlassen konnten, wurde in den mit DHEAS inkubierten Ansätzen zusätzlich zum Medium das Zelllysate untersucht. Dabei wurden in den verschiedenen Zelllinien ähnliche DHEAS-Konzentrationen detektiert, die 44,9 \pm 5,3 pmol/mg Protein (MW \pm SD) betrugen. Die Werte lagen am unteren Limit der Detektierbarkeit. 16 α -OH-DHEAS, E₁S, E₂S und PREGS wurden nicht detektiert.

E₁S wurde als weiteres Substrat getestet, da dessen Umsetzung zu Estradiol weniger Zwischenschritte beinhaltet (Abb. 4.19).

5 μ M E₁S

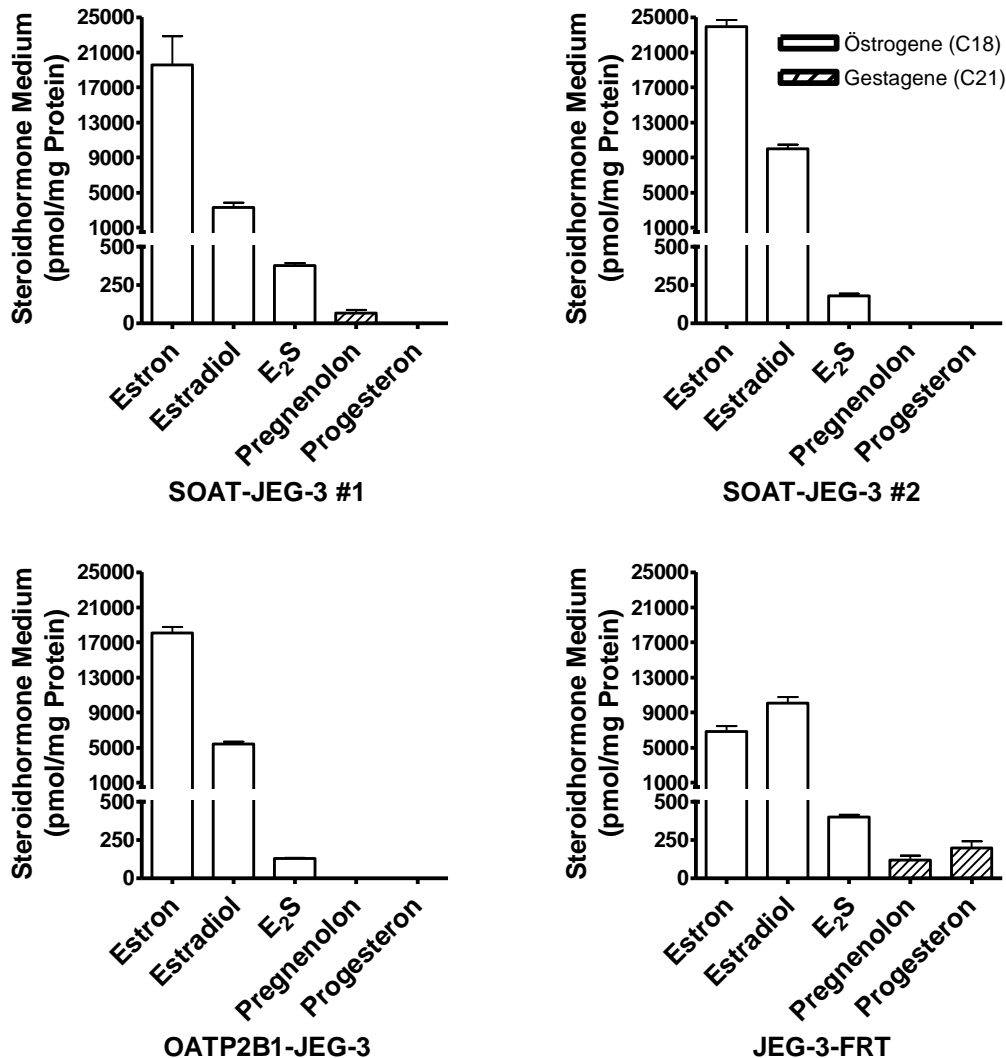


Abb. 4.19: Metabolismus von E₁S in SOAT- und OATP2B1-JEG-3- sowie JEG-3-FRT-Zellen

Stabil transfizierte SOAT- und OATP2B1-JEG-3-Zellen sowie deren untransfizierte Kontrollzelllinie JEG-3-FRT wurden über 24 h im Brutschrank mit 5 μ M E₁S inkubiert. Das Medium wurde entnommen und die Menge an Steroidhormonen mittels LC-MS-MS ermittelt. Die Werte entsprechen MW \pm SD einer Messung in Dreifachbestimmung.

Hierbei ergaben sich folgende Ergebnisse:

1. Die Estronsynthese aus E₁S war bei den Zellen SOAT-JEG-3 #1 und #2 sowie bei OATP2B1-JEG-3 im Vergleich zur Kontrolle JEG-3-FRT 2,5-3,5-fach höher. Ein Vergleich der Menge metabolisierten Ausgangssubstrats E₁S zeigt für SOAT-JEG-3 #2 und OATP2B1-JEG-3 einen erhöhten Verbrauch von E₁S an (Tab. 4.3).

2. Ein Vergleich der Experimente, bei denen die Zellen mit E₁S oder DHEAS inkubiert wurden zeigt, dass die Zellen mindestens doppelt so viel des Ausgangssubstrates E₁S verbrauchten, verglichen mit dem Ausgangssubstrat DHEAS (Tab. 4.2; Tab. 4.3).
3. Die Estradiolsynthese aus E₁S in SOAT-JEG-3 #1 und OATP2B1-JEG-3 war etwa halb so hoch wie in SOAT-JEG-3 #2 und in JEG-3-FRT.
4. Die Zellen konnten Estradiol sulfatieren und E₂S bilden.
5. Bei SOAT- und OATP2B1-JEG-3-Zellen war ebenso wie nach Inkubation mit DHEAS und DHEA sowohl die Pregnenolon- als auch die Progesteronsynthese vermindert gegenüber JEG-3-FRT-Zellen.

Tab. 4.3: Metabolisierung von E₁S durch stabil transfizierte SOAT- und OATP2B1-JEG-3-Zellen sowie JEG-3-FRT-Zellen

Aufgelistet ist der Verbrauch von E₁S durch SOAT-, OATP2B1-JEG-3- und JEG-3-FRT-Zellen nach 24 h. Die Ausgangskonzentration von E₁S betrug 5 µM. Der Umsatz von E₁S in SOAT- und OATP2B1-JEG-3-Zellen wurde mit dem Umsatz in den Kontrollzellen JEG-3-FRT verglichen. * p<0,01; ** p<0,001; statistisch signifikant erhöhter Umsatz gegenüber JEG-3-FRT; ns p>0,05: nicht signifikant; zweiseitiger ungepaarter t-Test.

Menge des nach 24 h umgesetzten E ₁ S in nmol/mg Protein (MW ± SD)			
SOAT-JEG-3 #1	23,3 ± 3,8	<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="margin-right: 10px;"> <div style="border-left: 1px solid black; height: 100px; position: relative;"> <div style="position: absolute; top: 0; right: -5px;">*</div> <div style="position: absolute; bottom: 0; right: -5px;">**</div> </div> </div> <div style="margin-right: 10px;"> <div style="border-left: 1px solid black; height: 100px; position: relative;"> <div style="position: absolute; top: 0; right: -5px;">ns</div> </div> </div> </div>	
SOAT-JEG-3 #2	34,1 ± 1,2		
OATP2B1-JEG-3	23,6 ± 0,7		
JEG-3-FRT	17,3 ± 1,3		

Bei Untersuchungen des Zelllysats wurden keine sulfatierten Steroide (E₁S, E₂S, DHEAS, 16α-OH-DHEAS, PREGS) detektiert. Dies zeigt, dass die gemessenen Steroidhormone im Zellkulturmedium den von den Zellen gebildeten Hormonmengen entsprechen und es nicht zu einer Ansammlung von sulfatierten Steroiden innerhalb der Zellen kam.

5 DISKUSSION

5.1 SOAT in der humanen Plazenta

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Steroidsulfattransporter SOAT in der humanen Plazenta zu lokalisieren. Zurückliegende Untersuchungen legten bereits nahe, dass sich in der Plazenta ein natriumabhängiger Steroidsulfattransporter befindet. Messungen an isolierten mononukleären Trophoblasten, in denen die beiden Steroidsulfattransporter OAT4 und OATP2B1 nachgewiesen wurden, zeigten eine Aufnahme von DHEAS, die in Abwesenheit von Natrium um fast 90 % vermindert war (Ugele et al. 2003). Bei OAT4 handelt es sich allerdings um einen partiell natriumabhängigen Transporter, dessen Aufnahme unter natriumfreien Bedingungen in OAT4-HEK293-Zellen lediglich um ca. 50 % reduziert ist, während die Aufnahme in OATP2B1-HEK293-Zellen sogar unabhängig von Natrium ist (Ugele et al. 2008). Beide Transporter sind daher eher nicht für die natriumabhängige Aufnahme von DHEAS in mononukleären Trophoblasten verantwortlich. Möglicherweise ist hieran der natriumabhängige Transporter SOAT beteiligt, dessen Transportcharakteristika ähnlich denen in den genannten Messungen an Trophoblasten sind. So war die Aufnahme von DHEAS in Trophoblasten hemmbar mit BSP und E₁S, aber nicht mit Taurocholat, Ouabain, Estron-3 β -D-Glucuronid und Estradiol-17 β -D-Glucuronid (Ugele et al. 2003; Geyer et al. 2007).

5.1.1 Lokalisation von SOAT

Die mit dem *Laser-assisted cell picking* erzielten Ergebnisse bestätigen auf mRNA-Ebene eine SOAT-Expression im Synzytiotrophoblasten und Gefäßendothel der humanen Plazenta, die sich bereits 2009 mittels Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung in der Dissertation von Dr. K. Funk an diesem Institut tendenziell angedeutet hat (Funk 2009). Zu berücksichtigen ist allerdings, dass die Proben beim *Laser-assisted cell picking* nicht frei von Bindegewebe gewonnen wurden, da beim Isolieren ein Sicherheitsabstand zum Zielgewebe gelassen wurde. Deshalb wurde zur Bestätigung eine In-situ-Hybridisierung mit einer neu generierten SOAT-spezifischen Sonde durchgeführt und SOAT-mRNA ebenfalls im Gefäßendothel und im Synzytiotrophoblasten lokalisiert, während die Vorgängerzellen, die Zytotrophoblasten, ungefärbt blieben.

Bereits im Jahr 2008 wiesen Ugele et al. auf den bisher ungeklärten Aufnahmemechanismus von sulfatierten Steroiden über die apikale Membran des Synzytiotrophoblasten hin. Während die Situation an der basalen Membran mit der Lokalisation der Transporter OAT4 und OATP2B1 bereits näher beleuchtet war, war an der apikalen Membran lediglich der

Transporter OATP4A1 bekannt, der aufgrund seiner niedrigen Aufnahmerate von E₁S allerdings eher als Schilddrüsenhormontransporter gesehen wurde (Tamai et al. 2000; Sato et al. 2003; Ugele et al. 2008). In dieser Arbeit konnte das SOAT-Protein mittels Immunhistochemie an der apikalen Membran des Synzytiotrophoblasten lokalisiert werden und damit ein Aufnahmemechanismus von sulfatierten Steroiden aus dem maternalen Blut aufgezeigt werden.

5.1.2 Physiologische Bedeutung von SOAT in der Plazenta

SOAT enthält in seinem Transportspektrum die Steroidsulfate DHEAS und E₁S (Geyer et al. 2004). Diese Steroidsulfate, insbesondere DHEAS, werden von der Plazenta als Vorläufer für die Östrogensynthese genutzt (Siiteri und MacDonald 1966) und können aufgrund der Lokalisation von SOAT an der apikalen Membran des Synzytiotrophoblasten über diesen Transporter aus dem maternalen Blut der Plazenta zugeführt werden. In dieser Arbeit wurden Plazenten aus dem dritten Trimester untersucht. Die Expression ist allerdings auch in früheren Phasen der Schwangerschaft wahrscheinlich, wenn die plazentare Östrogensynthese aufgrund der noch kleinen fetalen Nebenniere mehr von maternalen Vorstufen abhängt. Zusätzlich ist eine Hochexpression von SOAT bei pathologischen Zuständen vorstellbar, bei denen die Plazenta keine oder weniger C19-Steroide, wie DHEAS, von fetaler Seite aus erhält. Dies könnte bei Feten eine Rolle spielen, die von Aneenzephalie oder vom Down-Syndrom betroffen sind. Das Beispiel der Aneenzephalie gibt Hinweise auf eine ausgleichende Versorgung mit Östrogenvorstufen von maternaler Seite. Bei einem Fetus mit Aneenzephalie sind die Nebennieren aufgrund der fehlenden hypophysären ACTH-Stimulation atrophisch, so dass der Fetus kein DHEAS für die plazentare Östrogensynthese beisteuern kann. Die Estron- und Estradiolsynthese hängen normalerweise gegen Ende der Schwangerschaft gleichermaßen von fetalem und maternalem DHEAS ab (Siiteri und MacDonald 1966). Trotzdem liegen bei Schwangerschaften mit aneenzephalen Feten die Estronkonzentrationen im maternalen Plasma im normalen Bereich (Tulchinsky et al. 1977). Für Estradiol wurden verminderte Konzentrationen im maternalen Plasma und Urin gemessen, die zwischen 10 und 60 % der Konzentration bei normalen Schwangerschaften betragen (Frandsen und Stakemann 1964; MacDonald und Siiteri 1965; Tulchinsky et al. 1977). Bei Tulchinsky et al. (1977) waren die Estradiolkonzentrationen zwar im Durchschnitt gegenüber den Durchschnittskonzentrationen normaler Schwangerschaften vermindert, bei Betrachtung der Spannweite normaler Estradiolkonzentrationen fiel allerdings auf, dass diese tatsächlich bei acht von zehn Patienten mit aneenzephalen Feten im normalen Bereich lag. Die in der Nabelvene gemessenen Estradiolkonzentrationen waren ebenfalls normal. Dies deutet in Verbindung mit den im Normalbereich liegenden Estronkonzentrationen darauf hin, dass die Plazenta bei

fehlender Versorgung mit fetalem DHEAS einen gewissen Ausgleich durch erhöhte DHEAS-Aufnahme von maternaler Seite erzielen könnte, um die Estron- und Estradiolsynthese der Plazenta zu unterstützen. Die erhöhte DHEAS-Aufnahme könnte durch eine Hochregulation des SOAT-Proteins an der apikalen Membran zustande kommen. Einen weiteren Hinweis dafür geben die Hormonkonzentrationen im Nabelblut. Die DHEAS-Konzentration in der Nabelvene von Neugeborenen mit Anenzephalie ist wie zu erwarten niedrig und war in der Studie von Tulchinsky et al. (1977) in den meisten Fällen nicht detektierbar. Die DHEA-Konzentrationen waren allerdings nicht signifikant gegenüber den Normalwerten erniedrigt. Dies spricht ebenfalls für eine hohe Versorgung der Plazenta mit maternalem DHEAS, das in desulfatierter Form ins fetale Blut übergehen kann.

Im Gegensatz zu Estron und Estradiol kann die Synthese von Estriol in der Plazenta nicht durch maternale Vorstufen auf hohem Niveau gehalten werden. Für die Bildung von 90 % des Estriols bezieht die Plazenta normalerweise 16α -OH-DHEAS aus dem fetalen Blut, dessen Grundbaustein DHEAS in der fetalen Nebenniere gebildet wird und bei anenzephalen Feten nicht vorhanden ist (Siiteri und MacDonald 1966). Entsprechend ist die Konzentration von Estriol, das sowohl ins fetale als auch maternale Blut abgegeben wird, bei Schwangerschaften mit anenzephalen Feten stark vermindert und beträgt im mütterlichen Plasma etwa 4 % der normalen Konzentration (Tulchinsky et al. 1977).

Neben dem Synzytiotrophoblasten wurde SOAT im Endothel plazentarer Zotten detektiert, wo er die Aufnahme von Östrogenvorstufen aus dem fetalen Blut ermöglichen könnte, insbesondere von DHEAS und 16α -OH-DHEAS. Diese werden dann im nächsten Schritt über OAT4 und OATP2B1 an der basalen Membran der Synzytiotrophoblasten in die Zellen aufgenommen und stehen der Östrogensynthese zur Verfügung (Abb. 5.1).

Zusätzlich zur placentaren Östrogensynthese könnte SOAT auch eine Rolle in der Progesteronsynthese spielen, da ein mögliches Vorläufermolekül, nämlich PREGS, ebenfalls ein Substrat von SOAT ist (Geyer et al. 2007). Die höchste Konzentration an PREGS wird im Nabelblut gemessen und ist ein Produkt der fetalen Nebenniere. Seine Konzentration fällt bereits ab dem ersten Lebenstag ab und steigt erst nach dem 9. Lebensjahr wieder leicht an (de Peretti und Mappus 1983). Neben LDL-Cholesterol, das als primäres Substrat für die placentare Progesteronsynthese gesehen wird, wird ein alternativer Weg über PREGS in der Plazenta vermutet (Hill et al. 2010a, 2010b). Durch eine SOAT-vermittelte Aufnahme aus dem fetalen und maternalen Blut könnte es von der Plazenta für die Progesteronsynthese herangezogen werden.

5.2 Transport des Estriol-Vorläufers 16 α -OH-DHEAS

Neben der im vorangehenden Unterkapitel beschriebenen Lokalisation von SOAT war die Untersuchung des Estriol-Vorläufers 16 α -OH-DHEAS Gegenstand dieser Arbeit. Aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaft ist 16 α -OH-DHEAS auf Transporter angewiesen, die dessen Weg in die Zelle vermitteln. Die Transporter OAT4, SOAT und NTCP zeigten eine Transportaktivität für 16 α -OH-DHEAS, die im Folgenden näher erläutert wird.

5.2.1 Transporteigenschaften der getesteten Transporter

Die Transporter OAT4, SOAT, NTCP und OATP2B1 wurden in stabil transfizierten HEK293-Zellen bezüglich der Aufnahme von 16 α -OH-DHEAS getestet (Kapitel 4.2). Die Transporter wurden ausgewählt, da für sie eine Transportaktivität für sulfatierte Steroide nachgewiesen wurde (Craddock et al. 1998; Cha et al. 2000; Tamai et al. 2000; Kullak-Ublick et al. 2001; Geyer et al. 2004; Grube et al. 2006a; Ugele et al. 2008). Obwohl der Transport von 16 α -OH-DHEAS vor allem in der Plazenta eine Rolle spielt, wurde die Identifizierung der Transporter an HEK293-Zellen durchgeführt, die nicht plazentaren Ursprungs sind. HEK293-Zellen bieten sich vor allem für Untersuchungen an, bei denen nicht die Eigenschaft der Zelle selbst im Vordergrund steht, sondern das in die Zelle transfizierte Protein. Sie zeigen eine niedrige Expression von endogen vorhandenen Transportern, so dass die gezielte Untersuchung der stabil transfizierten Transporter möglich ist (Ahlin et al. 2009).

Die Affinität der Transporter zu 16 α -OH-DHEAS wurde über Transportkinetiken bestimmt. Hierbei gibt die Michaeliskonstante K_m an, bei welcher Substratkonzentration die Aufnahmegeschwindigkeit eines Substrates halbmaximal ist. Ein niedriger K_m -Wert weist somit auf eine hohe Affinität des Transporters zum Substrat hin. Die maximale Aufnahmegeschwindigkeit wird als V_{max} angegeben. Tab. 5.1 zeigt eine Gegenüberstellung der in meiner Arbeit ermittelten K_m - und V_{max} -Werte für 16 α -OH-DHEAS zu den kinetischen Daten für DHEAS aus der Literatur.

Tab. 5.1: Vergleich der kinetischen Parameter zwischen 16 α -OH-DHEAS und DHEAS in OAT4-, SOAT-, NTCP-, und OATP2B1-HEK293 Zellen K_m in μM , V_{max} in pmol/mg Protein/min

Zelllinie		16 α -OH-DHEAS	DHEAS	Quellen für DHEAS
OAT4-HEK293	K_m V_{max}	23,1 485,0	29,2 620	Ugele et al. 2008
SOAT-HEK293	K_m V_{max}	319,0 1465,8	28,7 1899	Geyer et al. 2007
NTCP-HEK293	K_m V_{max}	51,4 1423,3	56,1 2198	Grosser 2013
OATP2B1-HEK293	K_m V_{max}	- -	210 602	Ugele et al. 2008

OAT4: Für OAT4 wurde eine hohe Affinität zu 16 α -OH-DHEAS nachgewiesen ($K_m=23 \mu\text{M}$), die mit der bereits bekannten Affinität zu DHEAS im gleichen Zellsystem vergleichbar ist (Tab. 5.1). OAT4-HEK293-Zellen transportieren die Substrate DHEAS und E₁S in partiell natriumabhängiger Weise mit etwa 50 % niedrigerer Aufnahme bei Abwesenheit von Natrium (Ugele et al. 2008). Dies wurde nun ebenfalls für das Substrat 16 α -OH-DHEAS gezeigt, für das die Aufnahme unter natriumfreien Bedingungen etwa halbiert war. Mit seiner Lokalisation an der basalen Membran von Synzytiotrophoblasten scheint OAT4 zusätzlich zum bereits bekannten Transport von DHEAS und E₁S auch für die Zufuhr der Estriolvorstufe 16 α -OH-DHEAS in den Synzytiotrophoblasten zuständig zu sein (Abb. 5.1).

SOAT: OAT4 und SOAT transportieren das bereits bekannte Substrat DHEAS mit gleicher Affinität ($K_m=29 \mu\text{M}$). Die Affinität von SOAT zu 16 α -OH-DHEAS war allerdings mehr als 10-fach niedriger ($K_m=319 \mu\text{M}$; Tab. 5.1). Trotz der niedrigen Affinität zu 16 α -OH-DHEAS könnte SOAT mit seiner Lokalisation im Endothel der fetalen Blutgefäße in der Plazenta die Aufnahme von 16 α -OH-DHEAS aus dem fetalen Blut dennoch vermitteln, da dessen Konzentration mit ca. 10 μM etwa doppelt so hoch ist wie die von DHEAS (Laatikainen et al. 1980; Mathur et al. 1980; Kojima et al. 1981; Troisi et al. 2003). Aufgrund der höheren Affinität von SOAT zu DHEAS ist DHEAS jedoch wahrscheinlich das bevorzugte Substrat dieses Transporters. Dies zeigt sich auch an den gemessenen IC₅₀-Werten, die für eine Halbierung der Aufnahme von 200 nM DHEAS eine mehr als 1000-fach höhere Konzentration von 16 α -OH-DHEAS (304 μM) aufwiesen. Beide Substrate werden nach der SOAT-vermittelten Aufnahme aus dem fetalen Blut dem Synzytiotrophoblasten zugeführt, wo sie in Estradiol bzw. Estriol umgewandelt werden (Abb. 5.1).

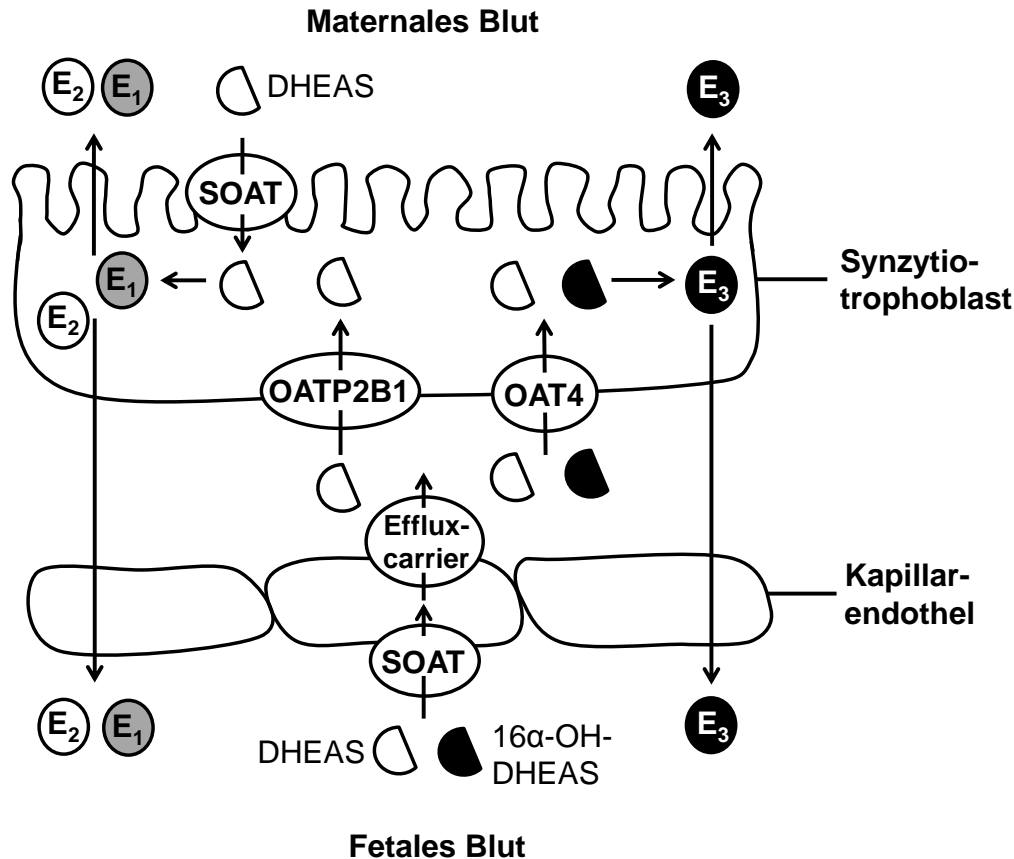


Abb. 5.1: Schematische Darstellung des vermuteten Zusammenspiels von Steroidsulfattransportern und der Synthese von Östrogenen in der humanen Plazenta

Der Steroidsulfattransporter SOAT wurde an der apikalen Membran des Synzyotrophoblasten detektiert und vermittelt die Aufnahme von Steroidsulfaten, wie DHEAS, aus dem maternalen Blut. Er wurde zudem im Kapillarendothel detektiert, wo eine Lokalisation an der dem Blut zugewandten Seite die Aufnahme von DHEAS und 16α-OH-DHEAS aus dem fetalen Blut vermitteln könnte. Nach Abgabe aus dem Endothel über Effluxcarrier, wie MRP1 oder MRP5 (Vähäkangas und Myllynen 2009), werden die Steroidsulfate von Transportern aufgenommen, die sich an der basalen Membran des Synzyotrophoblasten befinden. DHEAS wird hierbei von OATP2B1 und OAT4 aufgenommen, 16α-OH-DHEAS nur von OAT4. Im Synzyotrophoblasten wird DHEAS in Estron (E₁) und Estradiol (E₂) umgewandelt, 16α-OH-DHEAS wird zu Estriol (E₃) metabolisiert. Die Östrogene Estron, Estradiol und ggf. Estriol diffundieren durch die Lipidphase der Zellmembran durch passive Diffusion ins maternale und fetale Blut.

NTCP: NTCP ist ebenfalls ein Transporter für 16α-OH-DHEAS, dessen K_m -Wert von 51 μM für dieses Substrat ähnlich dem für das bereits bekannte Substrat DHEAS ist (Tab. 5.1). Allerdings wird NTCP nicht oder kaum in der Plazenta exprimiert (Patel et al. 2003; Ugele et al. 2003; Kapitel 1.4.2) und scheint somit keine Bedeutung für die plazentare Estriolsynthese zu haben.

OATP2B1: OATP2B1-HEK293-Zellen zeigten keine Transportaktivität für 16α-OH-DHEAS. Allerdings wurde bereits gezeigt, dass OATP2B1 auch für das verwandte Substrat DHEAS eine niedrige Affinität besitzt ($K_m > 200$ μM), die etwa 10 % der Affinität für E₁S beträgt (Ugele et al. 2008). Somit bleibt E₁S weiterhin das einzige bekannte relevante Steroidsulfat, das bei

physiologischen Konzentrationen durch OATP2B1 transportiert wird. Dieser Transporter zeigt eine breite Gewebeexpression (Tamai et al. 2000) und trägt gemeinsam mit der Sulfatase durch Aktivierung von E₁S zur Versorgung von Zellen mit einem basalen Östrogenlevel bei (Ugele et al. 2008).

5.2.2 Überlegungen zur Bedeutung des Steroidsulfattransports für die hohe plazentare Estriolsynthese

Die während der Schwangerschaft entstehenden Konzentrationen an Estriol im maternalen Plasma, die auch im Urin erscheinen, übersteigen die Konzentrationen von Estradiol um ein Vielfaches. Dies ist nicht anhand der Plasmakonzentrationen der entsprechenden Vorstufen 16 α -OH-DHEAS (Vorstufe von Estriol) und DHEAS (Vorstufe von Estradiol) erklärbar (Othman und Oakey 1996). 16 α -OH-DHEAS kommt im fetalen Blut zwar in etwa doppelt so hohen Konzentrationen vor wie DHEAS, doch wird die Plazenta zusätzlich auch von maternaler Seite aus mit DHEAS versorgt (Kapitel 1.2.3). Auch eine Präferenz der Enzyme Sulfatase und Aromatase gegenüber den 16 α -hydroxylierten Steroiden wurde ausgeschlossen und eine Bevorzugung der nicht-16 α -hydroxylierten Vorstufen DHEAS und Androstendion ermittelt. Die Ursache der hohen Estriolsynthese in der Plazenta konnte somit noch nicht geklärt werden (Dibbelt und Kuss 1983; Othman und Oakey 1996). Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens könnte in einer verstärkten transportervermittelten Aufnahme von 16 α -OH-DHEAS gegenüber DHEAS liegen, so dass im Synzytiotrophoblasten höhere lokale Konzentrationen der 16 α -hydroxylierten Metaboliten entstehen und vermehrt Estriol gebildet wird. Hierzu müssten Transporter vorhanden sein, die eine deutlich höhere Affinität zu 16 α -OH-DHEAS als zu DHEAS haben. Diese Voraussetzung trifft jedoch auf die in dieser Arbeit identifizierten 16 α -OH-DHEAS-Transporter SOAT und OAT4 nicht zu. SOAT wurde zwar im fetalen Gefäßendothel in den Chorionzotten detektiert, wo er die Aufnahme von sulfatierten Steroiden aus dem fetalen Blut vermitteln könnte. Wie im vorhergehenden Kapitel bereits erläutert, betrug die Affinität von SOAT zu 16 α -OH-DHEAS allerdings nur etwa 10 % der Affinität zu DHEAS, so dass 16 α -OH-DHEAS nicht das bevorzugte Substrat darstellt. OAT4 hat mit seiner Lokalisation an der basalen Membran der Synzytiotrophoblasten einen entscheidenden Einfluss auf die Zuführung von sulfatierten Steroiden in den Synzytiotrophoblasten. Allerdings war der K_m-Wert von 16 α -OH-DHEAS nur gering gegenüber dem Wert von DHEAS vermindert, d. h. die Affinität war nur unwesentlich höher. Dies reicht nicht aus, um von einer deutlich verstärkten Aufnahme von 16 α -OH-DHEAS gegenüber DHEAS auszugehen. Außerdem wird DHEAS zusätzlich von OATP2B1 an der basalen Membran und von SOAT an der apikalen Membran des Synzytiotrophoblasten in die Zelle aufgenommen (Abb. 5.1). Eine erhöhte lokale Konzentration von 16 α -OH-DHEAS im Synzytiotrophoblasten kann daher nicht über die in

dieser Arbeit identifizierten Transportproteine für 16 α -OH-DHEAS erklärt werden und das Rätsel um die hohe Estriolsynthese in der humanen Plazenta bleibt weiterhin ungelöst.

5.3 Steroidsulfattransporter in JEG-3-Zellen

Ein zentrales Ziel dieser Arbeit war es, die plazentaabstammende JEG-3-Zelllinie mit bekannten Steroidsulfattransportern stabil zu transfizieren, um die anteilige Bedeutung der jeweiligen Transporter für die Steroidsulfataufnahme zu ermitteln. Zunächst wurde ein Expressionsprofil über endogen vorhandene Transporter in JEG-3-Zellen erstellt und Aufnahmemessungen mit den sulfatierten Steroiden DHEAS und E₁S an nativen JEG-3-Zellen durchgeführt. Zusätzlich wurden die Zellen stabil mit den Transportern SOAT und OATP2B1 transfiziert und deren Einfluss auf die Östrogensynthese in Metabolismussmessungen untersucht.

5.3.1 Expressionsprofil

Messungen an isolierten Trophoblasten und JEG-3-Zellen in Suspension zeigen, dass JEG-3-Zellen im Gegensatz zu Trophoblasten innerhalb von 30 min nicht in der Lage sind, DHEAS aufzunehmen (Ugele und Simon 1999). Dies deutet an, dass native JEG-3-Zellen eine verminderte Expression von Transportern für sulfatierte Steroide aufweisen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden JEG-3-Zellen nicht in Suspension, sondern in Monolayern verwendet, wo eine Aufnahme von DHEAS und E₁S nachgewiesen werden konnte (Kapitel 4.3.2). Hierbei war die Aufnahme von DHEAS bereits nach 30 min gesättigt und blieb auf niedrigem Niveau, während die E₁S-Aufnahme selbst nach 30 min noch linear anstieg. Dies legt nahe, dass JEG-3-Zellen in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen doch Steroidsulfattransporter, insbesondere für E₁S, exprimieren können.

Durch Real-Time qRT-PCR von RNA aus JEG-3-Zellen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Transporter SOAT und OATP2B1, die im Zentrum dieser Arbeit standen, nur sehr gering exprimiert werden. Serrano et al. (2007) stellten passend dazu eine 14-fach niedrigere OATP2B1-Expression in JEG-3-Zellen im Vergleich zu humanen Trophoblastenzellen aus dem dritten Trimester fest.

Die qRT-PCR zeigte außerdem eine mittlere Expression des Transporters OAT4, der ebenfalls im Mittelpunkt dieser Arbeit stand. Eine Expression dieses Transporters in JEG-3-Zellen wurde bereits über RT-PCR nachgewiesen (Steckelbroeck et al. 2004) und eine Steigerung der OAT4-Expression nach Aflatoxin B1-Inkubation detektiert (Huuskonen et al. 2013).

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit wiederholt eine hohe Expression von OATP1A2 und erstmals von OATP4A1 in JEG-3-Zellen nachgewiesen. Serrano et al. (2007) detektierten

ebenfalls eine hohe OATP1A2-Expression, die 50-fach erhöht gegenüber humanen Trophoblastenzellen aus dem dritten Trimester war. Dies wird damit erklärt, dass JEG-3-Zellen eher mit Trophoblasten aus dem ersten Trimester vergleichbar sind, wo die Expression von OATP1A2 höher als im dritten Trimester ist (Patel et al. 2003; Serrano et al. 2007).

In der hier durchgeführten qRT-PCR war OATP4A1 mit Abstand der am höchsten exprimierte Influx-Transporter. Für OATP4A1 schrieben bereits Tamai et al. (2000), dass dieser Transporter in allen von ihnen getesteten Karzinomzelllinien vorkam. Mit JEG-3-Zellen, die von einem Chorionkarzinom abstammen, wurde in dieser Arbeit eine weitere OATP4A1-exprimierende Karzinomzelllinie identifiziert.

Für die hier beschriebenen Transporter sind die Lokalisationen in der Plazenta bekannt. Sie wurden in der Einleitung (Kapitel 1.5; 1.6) bzw. für SOAT im Verlauf dieser Arbeit (Kapitel 4.1) näher beschrieben. Ein weiterer Transporter, OATP3A1, konnte in der qRT-PCR mit geringer Expression in JEG-3-Zellen detektiert werden. In der Plazenta wurde OATP3A1 bisher lediglich auf mRNA-Ebene nachgewiesen (Tamai et al. 2000; Patel et al. 2003; Ugele et al. 2003); er zeigt eine niedrige Aufnahme von E₁S (Tamai et al. 2000).

Das Expressionsprofil verschiedener Steroidsulfattransporter in JEG-3-Zellen zeigt also, dass der Transporter OATP4A1 mit Abstand am höchsten exprimiert war, gefolgt von OAT4 und OATP1A2. Die Transporter SOAT, OATP2B1 und OATP3A1 waren lediglich gering exprimiert.

5.3.2 Transport von Steroidsulfaten

JEG-3-Zellen nehmen DHEAS und E₁S sowohl unter natriumhaltigen als auch natriumfreien Bedingungen auf. In Anwesenheit von Natrium war die Aufnahme gering höher (1,3-fach) als unter Verwendung von natriumfreiem Transportpuffer (Kapitel 4.3.2). Die Aufnahme von DHEAS in JEG-3-Zellen könnte durch die von JEG-3-Zellen exprimierten Transporter OAT4 und OATP1A2 erfolgen, die beide dieses Substrat in ihrem Substratspektrum haben (Kullak-Ublick et al. 1998; Cha et al. 2000; Ugele et al. 2008). Da OAT4 partiell natriumabhängig ist (Ugele et al. 2008), ist die erhöhte Aufnahme von DHEAS in JEG-3-Zellen unter natriumhaltigen Bedingungen erklärbar.

OAT4 könnte zusätzlich für die Aufnahme von E₁S zuständig sein, dessen Aufnahme in JEG-3-Zellen deutlich höher als von DHEAS ausfiel. Allerdings liegen die K_m- und V_{max}-Werte für diese beiden Substrate bei Untersuchungen in stabil transfizierten OAT4-HEK293-Zellen in einem ähnlichen Bereich, so dass OAT4 die Substrate DHEAS und E₁S vermutlich gleichermaßen gut transportiert (K_m=29 bzw. 22 µM; V_{max}=620 bzw. 581 pmol/mg Protein/min; Ugele et al. 2008). Er kann daher nicht alleinig für die auffallend höhere E₁S-Aufnahme in JEG-3-Zellen verantwortlich sein. Möglicherweise wird dieser Effekt durch

OATP4A1 unterstützt, der zwar vor allem als Schilddrüsenhormontransporter bekannt ist, allerdings auch gering E_1S transportiert (Tamai et al. 2000). Da dieser Transporter in JEG-3-Zellen mit Abstand am höchsten exprimiert ist, könnte er zur verstärkten E_1S -Aufnahme beitragen. Um eine genaue Zuweisung der Transporteigenschaften von JEG-3-Zellen zu bestimmten Transportern zu treffen, müssten die identifizierten Transporter einzeln gehemmt werden. Ein Vergleich der Aufnahmemessungen unter Verwendung von transporter-spezifischen Inhibitoren mit Messungen ohne Inhibitoren würde den Effekt der einzelnen Transporter auf die DHEAS- und E_1S -Aufnahme in JEG-3-Zellen erkennen lassen. Dieser Ansatz wurde aber aus verschiedenen Gründen nicht aufgegriffen. Nicht für alle Transporter waren geeignete Inhibitoren bekannt und die Auswahl von Inhibitoren, die nur einen ausgewählten Transporter hemmen und alle anderen gänzlich unbeeinträchtigt lassen, erschien nicht möglich. Stattdessen wurden einzelne Transporter selektiv in JEG-3-Zellen nach Transfektion zur Expression gebracht.

5.4 Stabile Transfektion von JEG-3-Zellen mit Steroidsulfattransportern

Ziel der stabilen Transfektion von JEG-3-Zellen mit den Transportern SOAT, OATP2B1 und OAT4 war es, die Rolle der einzelnen Transporter für die plazentare Östrogensynthese zu untersuchen. Eine Überprüfung der Transfektion mit verschiedenen Methoden ergab, dass die Transfektion mit SOAT und OATP2B1 erfolgreich war, nicht aber mit OAT4.

5.4.1 SOAT-JEG-3-Zellen

Von den selbst generierten SOAT-JEG-3-Zellen wurden zwei Klone untersucht, genannt #1 und #2. Unter natriumhaltigen Bedingungen war für beide eine erhöhte Aufnahme (1,3-fach) von DHEAS und E_1S gegenüber der Aufnahme in den Kontrollzellen JEG-3-FRT unter ebenfalls natriumhaltigen Bedingungen zu beobachten, während die Aufnahme unter natriumfreien Bedingungen gleich blieb (Kapitel 4.4.3). Diese Transporteigenschaften von SOAT-JEG-3-Zellen stimmen somit mit den bekannten Charakteristika von SOAT überein, bei dem es sich um einen natriumabhängigen Transporter handelt (Geyer et al. 2004). Eine Überexpression von SOAT in den beiden SOAT-JEG-3-Zelllinien wurde auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR gezeigt, wobei die Expression in Klon #2 geringer ausfiel als in Klon #1. Trotz seiner höheren mRNA-Expression zeigte Klon #1 gegenüber Klon #2 jedoch keine höhere Aufnahme von Steroidsulfaten, so dass davon ausgegangen werden kann, dass nicht die gesamte mRNA in Protein translatiert wurde, oder SOAT-Protein zwar gebildet, aber nicht komplett in die Zellmembran eingebaut wurde.

Im Western Blot war ein geringeres Vorkommen des SOAT-Proteins in SOAT-JEG-3-Zellen im Vergleich zu SOAT-HEK293-Zellen erkennbar, die als Positivkontrolle dienten. Trotz einer 40-fach höheren eingesetzten Proteinmenge in SOAT-JEG-3-Zellen fielen die Banden deutlich schwächer aus. Dies kann verschiedene Gründe haben. JEG-3-Zellen haben ein größeres Zellvolumen als HEK293-Zellen und synthetisieren aufgrund ihrer metabolischen Aktivität möglicherweise mehr Protein in Form von Enzymen und Transportern. Daher könnte der SOAT-Anteil in einer Proteinlösung aus JEG-3-Zellen generell kleiner als bei HEK293-Zellen sein. Ein weiterer Grund ist in einer geringeren SOAT-Expression in SOAT-JEG-3-Zellen zu sehen, die sich bereits im β -Galactosidase-Assay der Wirtszelllinien (FlpIn-HEK293 und FlpIn-JEG-3) andeutet. Der β -Galactosidase-Assay ermöglicht die Beurteilung der transkriptionellen Aktivität des für die stabile Transfektion vorgesehenen Genabschnittes. Hierbei war die β -Galactosidase-Aktivität der kommerziell erhältlichen FlpIn-HEK293-Zellen bis zu 10-fach höher als in den selbst generierten FlpIn-JEG-3-Zellen. Es ist daher davon auszugehen, dass die SOAT-DNA in HEK293-Zellen an einer transkriptionell aktiveren Stelle im Genom integriert ist. Des Weiteren fiel im Western Blot auf, dass die SOAT-Banden in SOAT-JEG-3-Zellen etwas höher lagen (54-59 kDa) als bei der Positivkontrolle, den SOAT-HEK293-Zellen (45-54 kDa). Die anhand der Anzahl an Aminosäuren berechnete Größe des Proteins liegt sogar lediglich bei 41,2 kDa (Geyer et al. 2007). Eine höhere Molekülmasse kann aber durch posttranslationale Modifikationen in Form von Glykosylierungen entstehen. Das Anheften von Zuckermolekülen an Stickstoff-Enden von Aminosäuren des Proteins wird als N-Glykosylierung bezeichnet. SOAT besitzt drei solcher potenzieller N-Glykosylierungsstellen, an Asparagin 4, 14 und 157 (Geyer et al. 2007). Bei SOAT-HEK293-Zellen werden verschiedene Glykosylierungsstadien vermutet, die ein Ausdehnen der Bande von 45-54 kDa erklären (Fietz et al. 2013). Die Bande bei 38 kDa liegt dagegen in der Nähe des berechneten Molekulargewichtes von SOAT und wurde ebenfalls in transient transfizierten U2OS-Zellen und für den Maus-Soat in stabil transfizierten mSoat-HEK293-Zellen gezeigt (Bijsmans et al. 2012; Grosser et al. 2013).

Auch bei SOAT-JEG-3-Zellen könnte eine Erhöhung des Molekulargewichtes durch Glykosylierung vorliegen. Zusätzlich könnten SOAT-Proteine in Verbindung mit anderen Proteinen als Heterodimere vorliegen, die ebenfalls ein hohes Molekulargewicht bewirken. Für den aus der gleichen Transporterfamilie stammenden Gallensäuretransporter NTCP wurde bereits eine Homodimerbildung bzw. Heterodimerbildung mit SOAT oder SLC10A4 *in vitro* beschrieben. Ebenso wurde eine Homodimerbildung für SOAT beschrieben (Bijsmans et al. 2012). In dem hier dargestellten Fall müsste SOAT jedoch mit kleineren Proteinen dimerisieren, um das nur gering erhöhte Molekulargewicht zu erreichen und die Dimere müssten stabil genug sein, um bei den denaturierenden Bedingungen des Western Blots erhalten zu bleiben.

5.4.2 OATP2B1-JEG-3-Zellen

Auch für OATP2B1-JEG-3-Zellen, in denen eine Überexpression von OATP2B1 mittels qRT-PCR bestätigt wurde, zeigte sich in Transportmessungen eine erhöhte Aufnahme von DHEAS und E₁S im Vergleich zu den Kontrollzellen JEG-3-FRT (Kapitel 4.4.3). Im Unterschied zu SOAT war diese nicht nur unter natriumhaltigen, sondern auch unter natriumfreien Bedingungen gegenüber den Kontrollzellen erhöht. Dies stimmt mit den Eigenschaften von OATP2B1 überein, bei dem es sich um einen natriumunabhängigen Transporter handelt (Hagenbuch und Stieger 2013). Die Aufnahme von DHEAS war 1,2-fach erhöht gegenüber den Kontrollzellen, von E₁S sogar 2,3-fach. Dieser Unterschied lässt sich anhand der in OATP2B1-HEK293-Zellen ermittelten Transportkinetiken erklären (Ugele et al. 2008). Hierbei wurde für OATP2B1 eine etwa 10-fach höhere Affinität zu E₁S als zu DHEAS festgestellt, während die V_{\max} -Werte vergleichbar waren. Die eingesetzten Konzentrationen von E₁S und DHEAS in den hier durchgeführten Messungen lagen im Bereich des K_m -Wertes von E₁S, daher fällt die Aufnahme dieses Substrates deutlich höher aus.

5.4.3 Bewertung der stabilen Transfektion von JEG-3-Zellen

Aus den beiden vorangehenden Unterkapiteln lässt sich zusammenfassend festhalten, dass SOAT- und OATP2B1-JEG-3-Zellen entsprechend ihrer jeweiligen Transportercharakteristika vermehrt DHEAS und E₁S transportieren und die stabile Transfektion somit erfolgreich war. Der Transport war allerdings mit einem Faktor von 1,2-2,3 gering bis mäßig gegenüber den JEG-3-FRT-Kontrollzellen erhöht und blieb damit hinter den Erwartungen zurück. Dies wird anhand des Vergleichs mit HEK293-Zellen deutlich, bei denen die Transportraten der stabil transfizierten Zelllinien um ein Vielfaches gegenüber den Kontrollzelllinien erhöht sind (Geyer et al. 2007). Eine Erklärung hierfür ist in den FlpIn-Wirtszelllinien zu sehen, die die Grundlage für die stabile Transfektion mit Transporter-DNA bildeten. Die selbst generierte FlpIn-JEG-3-Wirtszelllinie (JEG-3-FRT) wies im β -Galactosidase-Assay eine deutlich geringere Enzym-Aktivität im Vergleich zu den kommerziell erhältlichen FlpIn-HEK293-Zellen auf, wie in Kapitel 5.4.1 bereits erwähnt. Da der β -Galactosidase-Assay die transkriptionelle Aktivität des Genabschnitts widerspiegelt, an dem in den stabilen Zelllinien die Transporter-DNA eingefügt wird, zeichnete sich schon an dieser Stelle ab, dass die Transportaktivität der stabil transfizierten JEG-3-Zellen nicht an die der stabil transfizierten HEK293-Zellen heranreichen würde. Eine größere Auswahl an FlpIn-JEG-3-Wirtszellklonen hätte möglicherweise einen geeigneteren Klon als den in dieser Arbeit ausgewählten Klon JEG-3-FRT hervorbringen können. Allerdings zeigte sich die Generierung von geeigneten Klonen bei JEG-3-Zellen komplizierter als bei HEK293-Zellen. Bei der Erstellung der FlpIn-Wirtszelllinie ist die Generierung von Einzelklonen, also Klonen, die von einer einzigen Zelle

abstammen, essentiell, da alle Zellen einer entstehenden Zelllinie die *FRT site* idealerweise an der gleichen Stelle im Genom integriert haben. Diese Selektion von Einzelklonen ist in JEG-3-Zellen erschwert, da sich diese Zellen meist in einem Verbund von mehreren Zellen auf dem Zellkulturflaschenboden absetzen. Es entstand zudem der Eindruck, dass zu starkes Vereinzeln der Zellen zu einer erhöhten Absterberate der sich einzeln abgesetzten Zellen führte, so dass einige Zellklone verloren gingen.

Auffällig war außerdem, dass JEG-3-Zellen eine stark erhöhte Sensitivität gegenüber den für die stabile Transfektion benötigten Selektionsantibiotika zeigten und bereits Konzentrationen zelltoxisch waren, die 10 % der üblicherweise bei HEK293-Zellen eingesetzten Konzentrationen betrug. Auch wenn die Selektion der stabilen JEG-3-Zelllinien entsprechend mit geringen Antibiotika-Konzentrationen durchgeführt wurden, ist vorstellbar, dass die permanente Inkubation der Zellen mit Antibiotika über mehrere Monate dennoch toxische Effekte auf JEG-3-Zellen hatte, die beispielsweise in einer verminderten Expression von Genen, beispielsweise der genannten Transporter, mündeten.

5.5 Metabolismusmessungen an JEG-3-Zellen

JEG-3-Zellen exprimieren die nötigen Enzyme, um aus Cholesterol Progesteron und aus C19-Steroiden Östrogene zu synthetisieren (Kohler et al. 1971; Kohler und Bridson 1971; Samson et al. 2009). Daher eignen sich JEG-3-Zellen besonders für die Untersuchung der steroidogenen Eigenschaften der Plazenta. Voraussetzung ist allerdings, dass besondere Zellkultivierungsmaßnahmen getroffen werden, die ausschließen, dass im Zellkulturmedium bereits Steroidhormone vorhanden sind. Dies geschieht durch Filtration des fetalen Kälberserums (FKS) über Aktivkohle, so dass die Zellen bereits vor Beginn der Messung frei von exogen zugeführten Steroidhormonen waren. Die Messung selbst wurde in serumfreiem Medium (Ham's F12) durchgeführt. Gestartet wurde die Messung durch Zugabe von Östrogenvorstufen in das Medium (DHEAS, DHEA, 16 α -OH-DHEAS, E₁S) und nach 24 h beendet durch Entnahme des Mediums mit anschließender Analyse der enthaltenen Steroidhormone mittels LC-MS-MS. Die im Medium gemessenen unkonjugierten Steroide entsprechen den von den Zellen synthetisierten Mengen, da diese aufgrund ihrer Lipophilie ungehindert ins Medium diffundieren. Eine Untersuchung im Zelllysat ergab zudem keine hohen Mengen an sulfatierten Steroiden, so dass auch hier die im Medium gemessenen Mengen etwa den synthetisierten Mengen entsprechen. Aufgrund der hohen Expression des Effluxtransporters *Breast Cancer Resistance Protein* BCRP (qRT-PCR JEG-3-Zellen, Kapitel 4.3.1) werden sie möglicherweise recht schnell von den Zellen ins Medium abgegeben.

5.5.1 Metabolismus von nativen JEG-3-Zellen

Zusätzlich zur Untersuchung des Metabolismus von stabil mit Transportern transfizierten JEG-3-Zellen wurde zur näheren Charakterisierung der Zellen eine Messung an nativen JEG-3-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden für 24 h mit 5 μ M DHEAS, DHEA oder 16 α -OH-DHEAS inkubiert und die gebildeten Steroidhormone im Medium bestimmt. Die Konzentration von 5 μ M wurde gewählt, da diese in etwa der Konzentration der sulfatierten Steroide DHEAS und 16 α -OH-DHEAS während der Schwangerschaft entspricht. Die unsulfatierte Form DHEA kommt zwar physiologisch in wesentlich geringeren Konzentrationen vor, wurde aber zum direkten Vergleich in gleicher Konzentration angeboten. Im Folgenden werden die in Kapitel 4.5.1 aufgelisteten Ergebnisse diskutiert:

1. Nach Inkubation mit DHEAS bzw. DHEA wurden Estradiol sowie die auf dem Weg entstehenden Zwischenprodukte Androstendion und Testosteron gebildet. Estron hingegen wurde nicht detektiert.

JEG-3-Zellen exprimieren die nötigen Enzyme, um aus C19-Steroiden Östrogene zu synthetisieren. Hierbei handelt es sich um die Enzyme Sulfatase, 3 β -HSD Typ1, 17 β -HSD Typ 1, 7 und 12 sowie Aromatase (Samson et al. 2009; qRT-PCR JEG-3-Zellen, Kapitel 4.3.1). Estron wurde in diesem Fall nicht detektiert, da es vermutlich schnell und vollständig durch die 17 β -HSD zu Estradiol metabolisiert wurde.

2. Sowohl nach DHEAS- als auch nach DHEA-Inkubation kam es zu einem Anstau von Androstendion. Die gebildete Estradiolmenge war nach DHEAS-Inkubation genauso hoch wie nach DHEA-Inkubation.

DHEA kann aufgrund seiner Lipophilie die Zellmembran durch passive Diffusion durchqueren und steht den Zellen ungehindert für die Estradiolsynthese zur Verfügung. Die sulfatierte Form DHEAS ist wegen ihrer Sulfatgruppe hingegen auf die Aufnahme durch Steroidsulfattransporter angewiesen, die in JEG-3-Zellen geringer vorkommen als in Trophoblastenzellen (Ugele und Simon 1999). Die Inkubation von JEG-3-Zellen mit äquimolaren Konzentrationen an DHEAS und DHEA lässt daher eine höhere Versorgung der Zellen mit DHEA erwarten, was in einer höheren Estradiolsynthese aus DHEA als aus DHEAS münden müsste. Während der Metabolismusmessung wurden hingegen aus beiden Vorläufermolekülen gleiche Mengen an Estradiol gebildet. Dies zeigt, dass JEG-3-Zellen genug DHEAS aufnehmen, um das Enzymsystem dieser Zellen vollständig abzusättigen. Der Anstau von Androstendion offenbart, dass die Begrenzung der Östrogensynthese durch das Enzym Aromatase vermittelt wird, dessen begrenzte Kapazität die Umwandlung von Androstendion in Estron limitiert. Eine beliebige Steigerung der Östrogensynthese durch Anbieten höherer Konzentrationen von Vorläufermolekülen wird somit verhindert und die

erhaltenen Estradiolmengen bleiben im Vergleich zum eingesetzten Ausgangssubstrat recht gering. Zum besseren Verständnis ist der Syntheseweg von Estradiol in Abb. 5.2 dargestellt.



Abb. 5.2: Syntheseweg von Estradiol

Bei Inkubation von JEG-3-Zellen mit 5 μM DHEAS oder DHEA ist das Enzym Aromatase das geschwindigkeitsbegrenzende Enzym im Syntheseweg von Estradiol. Es kam zu einem Anstau von Androstendion und die Östrogene Estron und Estradiol wurden nur in geringer Menge gebildet.

Untersuchungen von Gibb und Lavoie (1984) an Plazentamikrosomen eröffneten Einsichten in das Zusammenspiel der an der Estradiolsynthese beteiligten Enzyme und erklären die hier erzielten Ergebnisse. Es stellte sich auch dort heraus, dass die Aromatase das geschwindigkeitsbegrenzende Enzym während der Estradiolsynthese darstellt. Die während des Synthesewegs vorangehenden Enzyme Sulfatase und 3 β -HSD besitzen in humanen Plazentamikrosomen vergleichbare maximale Umsatzgeschwindigkeiten (V_{max}) für ihre Substrate (2 bzw. 1,8 nmol/mg Protein/min), während die Umsatzgeschwindigkeit der Aromatase nur etwa 6 % davon beträgt (0,12 nmol/mg Protein/min). Somit wird bei maximal erreichten Umsatzgeschwindigkeiten Androstendion in einer höheren Geschwindigkeit gebildet, als es von der Aromatase zu Estron weitermetabolisiert werden kann und es kommt zu einem Anstau von Androstendion. Estron und Estradiol können nur in geringer Menge gebildet werden. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass die tatsächlich erreichten Umsätze der Enzyme von deren Affinität zum Substrat und der vorliegenden Substratkonzentration abhängen. Die Michaeliskonstanten (K_m) der 3 β -HSD und Aromatase zu ihren Substraten DHEA bzw. Androstendion liegen im Bereich um 15 nM. Diese Konzentration wurde in der hier durchgeführten Messung überschritten, so dass davon ausgegangen werden kann, dass beide Enzyme mit maximalen Umsatzgeschwindigkeiten arbeiteten. Die Sulfatase, die den ersten Schritt bei der Metabolisierung von DHEAS vornimmt, hat eine wesentlich geringere Affinität zum Substrat DHEAS, was anhand des K_m -Wertes von 16 μM deutlich wird. Die maximale Umsatzgeschwindigkeit wird daher erst bei deutlich höheren Konzentrationen an DHEAS erreicht. Durch eine Inkubation mit 5 μM DHEAS wurden in den hier durchgeführten Metabolismussmessungen jedoch bereits so hohe intrazelluläre Konzentrationen erreicht, dass die Umsatzgeschwindigkeit der Sulfatase die Geschwindigkeit der Aromatase bei weitem überstieg. Es kam daher, wie oben beschrieben, sowohl nach Inkubation mit DHEA als auch mit DHEAS zu einem Anstau von Androstendion, dessen Umwandlung zu Estron durch die Aromatase begrenzt war. Somit entstanden aus DHEA und DHEAS vergleichbare Mengen an Estradiol. Für einen Überblick über den Zusammenhang von Substratkonzentration und Umsatzgeschwindigkeit der Enzyme sind die Ergebnisse aus Gibb und Lavoie (1984) in Abb. 5.3 dargestellt.

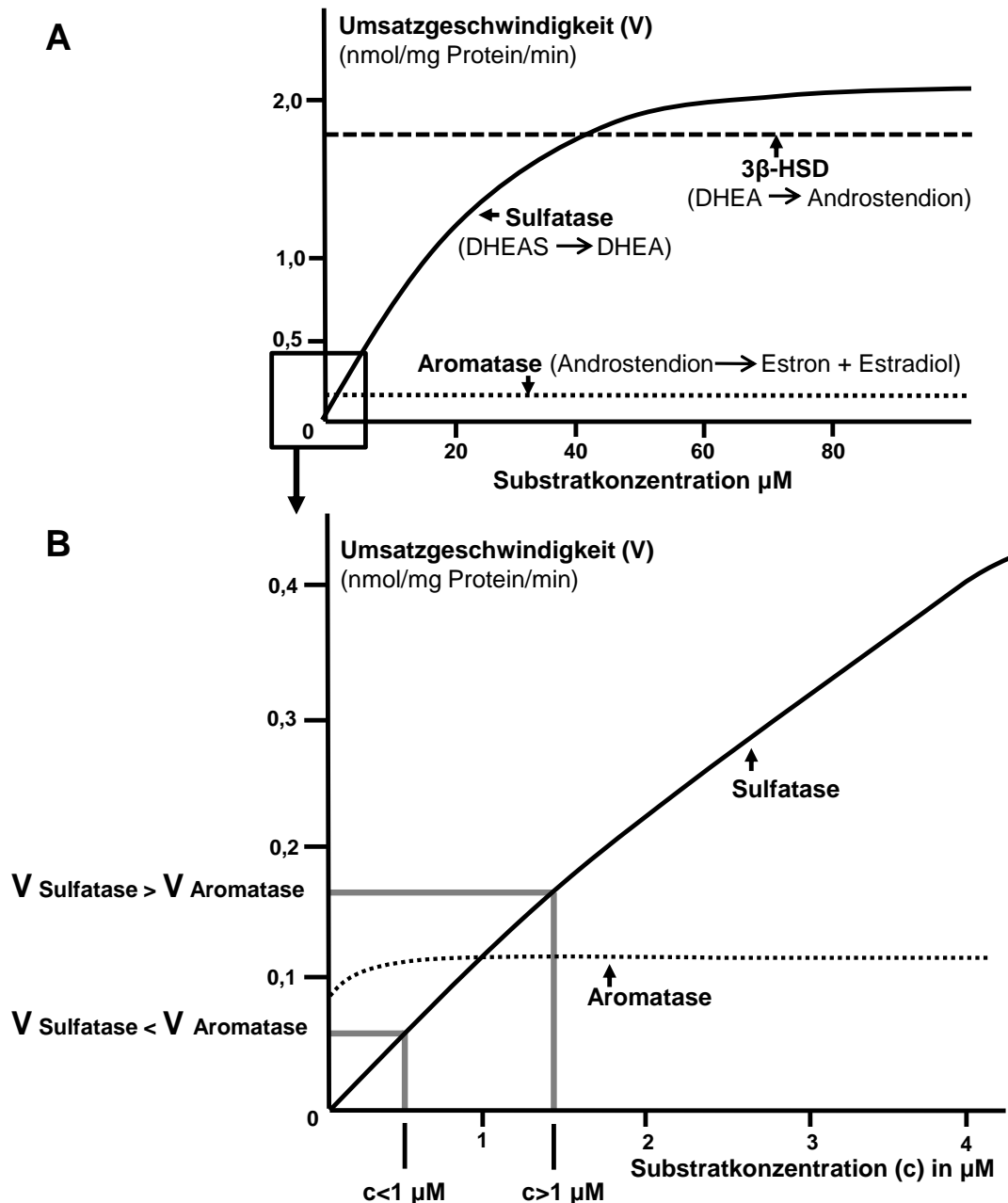


Abb. 5.3: Umsatzgeschwindigkeiten der Sulfatase und Aromatase in Abhängigkeit von der Substratkonzentration in humanen Plazentamikrosomen

(A) Die maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}) der Aromatase ist erheblich niedriger als die Geschwindigkeit der Sulfatase oder der 3 β -HSD.

(B) Bei Substratkonzentrationen unter $1 \mu\text{M}$ unterliegt die Umsatzgeschwindigkeit der Sulfatase der Geschwindigkeit der Aromatase, so dass die Sulfatase das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Östrogensynthese darstellt. Bei Konzentrationen über $1 \mu\text{M}$ ist die Umsatzgeschwindigkeit der Sulfatase in humanen Plazentamikrosomen höher als die der Aromatase, so dass es zu einem Anstau von DHEA und Androstendion kommt. In diesem Fall, der auch in den Metabolismusmessungen mit JEG-3-Zellen eintrat, ist die Aromatase das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Östrogensynthese (Gibb und Lavoie 1984).

Die limitierte Estradiolsynthese wird auch in einer Veröffentlichung von Zbella et al. (1986) an JEG-3-Zellen gezeigt. Ab einer DHEAS-Konzentration von 500 ng/ml (ca. $2,5 \mu\text{M}$) war die Estradiolsynthese nicht mehr steigerbar, während die Aromatase-unabhängigen Metaboliten

DHEA, Androstendion und Testosteron nach Inkubation mit steigenden DHEAS-Konzentrationen weiter anstiegen.

Anders ist die Situation bei Inkubation mit niedrigen DHEAS- und DHEA-Konzentrationen. Bahn et al. (1981) inkubierten JEG-3-Zellen mit Östrogenvorläufern unter 20 nM und erhielten eine höhere Estradiolsynthese aus DHEA als aus DHEAS. Dies ist mit den von Gibb und Lavoie (1984) dargestellten und oben erwähnten Michaeliskonstanten der Enzyme erklärbar. Der K_m -Wert der Sulfatase liegt im μM -Bereich, so dass diese bei DHEAS-Konzentrationen im nM-Bereich weit von ihrer maximalen Umsatzgeschwindigkeit entfernt ist. Sie erreicht dann lediglich eine Geschwindigkeit, die unterhalb der Umsatzgeschwindigkeit der Aromatase liegt. Das geschwindigkeitsbegrenzende Enzym bei niedrigen DHEAS-Konzentrationen ist daher nicht mehr die Aromatase, sondern die Sulfatase. In diesem Fall entsteht nur wenig desulfatiertes Substrat, das für die Weitermetabolisierung zur Verfügung steht. Aus DHEAS wird folglich weniger Estradiol gebildet wie aus äquimolaren DHEA-Konzentrationen (Abb. 5.3). Diese Beobachtung erfolgte ebenfalls in Untersuchungen von Schut und Townsley (1977), die sowohl in intakten JEG-3-Zellen als auch in Zellhomogenat niedrigere Syntheseraten aus DHEAS als aus DHEA erzielten. Da dieses Ergebnis auch in Zellhomogenat erzielt wurde, kann ausgeschlossen werden, dass die transporterbedingte Aufnahme in die Zellen der limitierende Faktor in JEG-3-Zellen ist.

3. Die Zellen besaßen die Fähigkeit, den Steroidring am Kohlenstoff C16 zu hydroxylieren. So entstanden nach Inkubation mit DHEAS sowohl 16 α -OH-DHEAS als auch 16 α -OH-DHEA, während nach Inkubation mit DHEA nur 16 α -OH-DHEA entstand.

Die Metaboliten 16 α -OH-DHEAS und 16 α -OH-DHEA wurden in den anderen genannten JEG-3-Studien nicht nachgewiesen (Kohler et al. 1971; Schut und Townsley 1977; Bahn et al. 1981; Zbella et al. 1986; Samson et al. 2009). In der qRT-PCR im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Expression der 16 α -Hydroxylasen CYP3A4 und CYP3A7 in JEG-3-Zellen detektiert. Eine 16 α -Hydroxylasefähigkeit der Plazenta ist allerdings fraglich. Dieses Thema wird daher in einem Extrakapitel (Kap. 5.6) näher behandelt.

4. Bei Inkubation der Zellen mit DHEAS metabolisierten die Zellen $7,8 \pm 1,4$ nmol DHEAS/mg Protein in 24 h in Androgene und Östrogene (MW \pm SD). Bei DHEA waren es $15,4 \pm 3,1$ nmol DHEA/mg Protein in 24 h.

Im Gegensatz zu DHEAS ist die unsulfatierte Form DHEA nicht auf die Aufnahme durch Transporter angewiesen. Zusätzlich entfällt ein Enzymschritt während der Metabolisierung, nämlich die Desulfatierung durch die Sulfatase. Daher verbrauchen die Zellen unter vergleichbaren Bedingungen mehr DHEA als DHEAS. Allerdings resultiert der

vergleichsweise hohe Verbrauch von DHEA aufgrund der unter Punkt 2 genannten begrenzten Umsatzgeschwindigkeit der Aromatase nicht in einer erhöhten Estradiolsynthese. Der Verbrauch von DHEA bzw. DHEAS sollte sich in der Ausbeute an synthetisierten Metaboliten widerspiegeln. Jedoch ist der hohe Verbrauch von DHEA nach Aufaddition der im Balkendiagramm dargestellten Metabolite nicht ersichtlich und es scheint trotz eines hohen DHEA-Verbrauchs eine geringere Ausbeute an gebildeten Steroidhormonen vorzuliegen, im Vergleich zu dem parallel durchgeführten DHEAS-Experiment. Zu beachten ist allerdings, dass der Metabolit 16 α -OH-DHEA nicht im Balkendiagramm aufgetragen ist, da eine genaue Quantifizierung mittels LC-MS-MS zunächst etabliert werden müsste.

5. JEG-3-Zellen bildeten Pregnenolon und Progesteron. Auffällig ist, dass nach Inkubation mit DHEA die Progesteronsynthese gehemmt war, während nach Inkubation mit DHEAS beide Hormone gebildet wurden.

Die Synthese von Pregnenolon und Progesteron aus dem endogen vorhandenen Cholesterol wurde bereits von den „Erfindern“ der JEG-3-Zellen, Kohler und Bridson (1971) beschrieben und benötigt keine zusätzlich eingesetzten Vorstufen. Die Umwandlung von DHEA zu Androstendion und von Pregnenolon zu Progesteron wird durch das gleiche Enzym, die 3 β -HSD, katalysiert (Pasqualini 2005). Da DHEA nach Inkubation der Zellen mit einer Konzentration von 5 μ M in hohem Überschuss vorkommt, ist eine kompetitive Verdrängung von Pregnenolon von der Bindungsstelle des Enzyms vorstellbar, so dass Progesteron nicht gebildet wird. Bei DHEAS fällt die Verdrängung nicht so stark aus, da dieses erst zu DHEA desulfatiert werden muss.

Die Hemmung der Progesteronsynthese durch DHEAS wurde in JEG-3-Zellen (Ritvos 1988) und durch DHEA und DHEAS in primären Plazentazellen in Zellkultur (Branchaud et al. 1983) beschrieben. Auch Androstendion, das in den gezeigten Metabolismusmessungen in hohen Konzentrationen gebildet wurde, ist als Inhibitor der 3 β -HSD beschrieben worden. Untersuchungen an isolierten Plazentazellen (Grimshaw et al. 1983) und Plazentamikrosomen sowie Plazentafragmenten (Raimondi et al. 1989) zeigten eine Hemmung der Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron durch DHEA und Androstendion.

6. Nach Inkubation mit 16 α -OH-DHEAS waren die Zellen in der Lage, dieses zu 16 α -OH-DHEA zu desulfatieren und in Estriol umzuwandeln.

Die Fähigkeit der Estriolsynthese aus 16 α -OH-DHEAS bestätigt das Ergebnis von Zbella et al. (1986). Neu ist hierbei die Detektion des unsulfatierten Metaboliten 16 α -OH-DHEA, der allerdings nicht genau quantifiziert werden konnte.

5.5.2 Metabolismus von stabil mit Transportern transfizierten JEG-3-Zellen

Stabil mit SOAT oder OATP2B1 transfizierte JEG-3-Zellen wurden mit 5 μ M DHEAS, DHEA oder E₁S inkubiert und die nach 24 h synthetisierten Steroide mittels LC-MS-MS gemessen. Ziel war es, einen Einfluss der Transporter SOAT und OATP2B1 auf die Östrogensynthese zu untersuchen. Die in Kapitel 4.5.2 aufgelisteten Ergebnisse der Inkubation mit DHEAS, DHEA und E₁S werden im Folgenden zusammengefasst und gemeinsam diskutiert.

1. Die DHEA-Synthese aus DHEAS war bei den Zellen SOAT-JEG-3 #2 und OATP2B1-JEG-3 etwa doppelt so hoch wie bei der Kontrolle JEG-3-FRT. Ein Vergleich des nach 24 h metabolisierten Anteils von DHEAS zeigt, dass diese beiden Zelllinien mehr DHEAS verbraucht haben als JEG-3-FRT-Zellen, wobei sich für OATP2B1-Zellen lediglich eine Tendenz ergab, die nicht statistisch signifikant war. Bei Inkubation mit der unsulfatierten Form DHEA hingegen lag der Verbrauch von DHEA bei allen Zelllinien in einem ähnlichen Bereich.

Die Estronsynthese aus E₁S war bei den Zellen SOAT-JEG-3 #1 und #2 sowie bei OATP2B1-JEG-3 im Vergleich zur Kontrolle JEG-3-FRT 2,5-3,5-fach höher. Ein Vergleich der Menge metabolisierten Ausgangssubstrats E₁S zeigt für SOAT-JEG-3 #2 und OATP2B1-JEG-3 einen erhöhten Verbrauch von E₁S an.

Diese Beobachtungen deuten auf eine erhöhte SOAT- bzw. OATP2B1-vermittelte Aufnahme von DHEAS bzw. E₁S in SOAT-JEG-3 #2- und OATP2B1-JEG-3-Zellen hin. Die beiden Substrate werden rasch von der Sulfatase desulfatiert und als DHEA bzw. Estron gemessen. Die erhöhte Aufnahme der beiden Steroidsulfate in die genannten stabil transfizierten Zelllinien wurde ebenfalls an radioaktiv markierten Substraten in Transportmessungen gezeigt und bestätigt dieses Ergebnis (Kapitel 4.4.3). Bei Inkubation der Zellen mit der unsulfatierten Form DHEA unterschied sich der Verbrauch nicht zwischen den verschiedenen Zelllinien, da dieses Substrat transporterunabhängig in die Zellen gelangt.

2. Trotz der erhöhten DHEAS-Aufnahme und DHEA-Bildung in SOAT-JEG-3 #2- und OATP2B1-JEG-3-Zellen wurde nicht vermehrt Androstendion gebildet.

Wie in Kapitel 5.5.1 aufgeführt, liegt der K_m-Wert der 3 β -HSD für die Umsetzung von DHEA bei 15 nM. Nach 24 h lagen allerdings im Medium DHEA-Konzentrationen zwischen 350 und 1100 nM vor. Dies zeigt, dass die 3 β -HSD im Bereich der Sättigung arbeitete und daher aus dem vermehrt gebildeten DHEA nicht mehr Androstendion bilden konnte.

3. OATP2B1-JEG-3-Zellen bildeten trotz höherer DHEAS-Aufnahme genauso viel Estradiol wie JEG-3-FRT-Zellen. Die Estradiolsynthese aus E_1S war etwa halb so hoch wie in JEG-3-FRT-Zellen.

Die begrenzte Estradiolsynthese bei Inkubation mit DHEAS erklärt sich zum einen aus dem vorhergehenden Punkt, nach dem eine erhöhte DHEAS-Aufnahme in den Transporter-transfizierten Zelllinien nicht in einer Steigerung der Androstendionsynthese resultiert. Doch selbst höhere Androstendionkonzentrationen führen nicht zu einer gesteigerten Östrogensynthese, da das zugehörige Enzym, die Aromatase, als geschwindigkeitsbegrenzendes Enzym hier die Estronsynthese limitiert, wie schon in Kapitel 5.5.1 erläutert. Somit ergab sich aus der transporterbedingt erhöhten DHEAS-Aufnahme keine Steigerung der Estradiolsynthese.

Bei Inkubation von OATP2B1-JEG-3-Zellen mit E_1S fiel die Estradiolsynthese vermindert aus. Möglicherweise ist bei dieser Zelllinie im Laufe der stabilen Transfektion eine Beeinträchtigung des Enzyms 17β -HSD entstanden, das die hohen Estronmengen langsamer umsetzt als in untransfizierten Zellen.

4. Bei SOAT-JEG-3 #1 war die Estradiolsynthese sowohl nach DHEAS- als auch nach DHEA-Inkubation stark vermindert gegenüber den Kontrollzellen. Daher wurde ein zweiter SOAT-Klon, SOAT-JEG-3 #2 getestet, der ebenfalls eine verminderte Estradiolsynthese nach DHEAS-Inkubation zeigte, die allerdings trotzdem höher war als bei Klon #1. Die Estradiolsynthese aus E_1S war bei Klon #1 etwa halb so hoch wie in JEG-3-FRT-Zellen.

Auffällig ist bei beiden SOAT-JEG-3-Zellklonen, dass die Estradiolsynthese nicht nur aufgrund der oben beschriebenen Effekte limitiert war, sondern sogar unterhalb der Werte von JEG-3-FRT-Zellen lag. Da dieser Effekt ebenfalls nach DHEA-Inkubation auftrat, das durch Diffusion in die Zelle gelangt, ist ein alleiniger transporterbedingter Effekt ausgeschlossen und die Ursache könnte im Bereich der Enzyme liegen. Transportmessungen mit $[^3H]DHEAS$ und $[^3H]E_1S$ zeigten, dass beide SOAT-Zellklone die Substrate gleichermaßen gut aufnehmen. In den Metabolismusmessungen ist jedoch nur bei Klon #2 ein erhöhter Verbrauch von DHEAS und E_1S detektierbar. Die erhöhte Aufnahme von Substraten bei Klon #1 scheint daher durch eine Einschränkung der Sulfatase maskiert zu sein, so dass vermehrt aufgenommenes Substrat nicht desulfatiert und damit nicht verbraucht wird.

Die Steroidprofile nach DHEAS-, DHEA- und E_1S -Inkubation geben Hinweise auf weitere eingeschränkte Enzyme, die in Abb. 5.4 zusammenfassend dargestellt sind. Da Androstendion ausreichend gebildet wurde, scheint die 3β -HSD normal zu arbeiten. Eine Beeinträchtigung könnte im darauf folgenden Enzym, der Aromatase vorliegen, da die Metaboliten Estron und Estradiol vermindert gebildet wurden. Zusätzlich wurde nach der

Inkubation mit E₁S Estron von Klon #1 weniger effektiv in Estradiol umgewandelt als bei Klon #2. Möglicherweise ist hier die 17 β -HSD beeinträchtigt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Überexpression des SOAT-Proteins in JEG-3-Zellen hemmende Effekte auf die Estradiolsynthese hatte, wovon Klon #1 am stärksten betroffen war.

5. Bei SOAT- und OATP2B1-JEG-3-Zellen war sowohl die Pregnenolon- als auch die Progesteronsynthese vermindert gegenüber JEG-3-FRT-Zellen.

Eine Ursache für die verminderte Pregnenolon- und Progesteronsynthese könnte in einer Einschränkung des Enzyms P450_{scc} liegen, das die Umwandlung von Cholesterol in Pregnenolon vornimmt (Abb. 5.4).

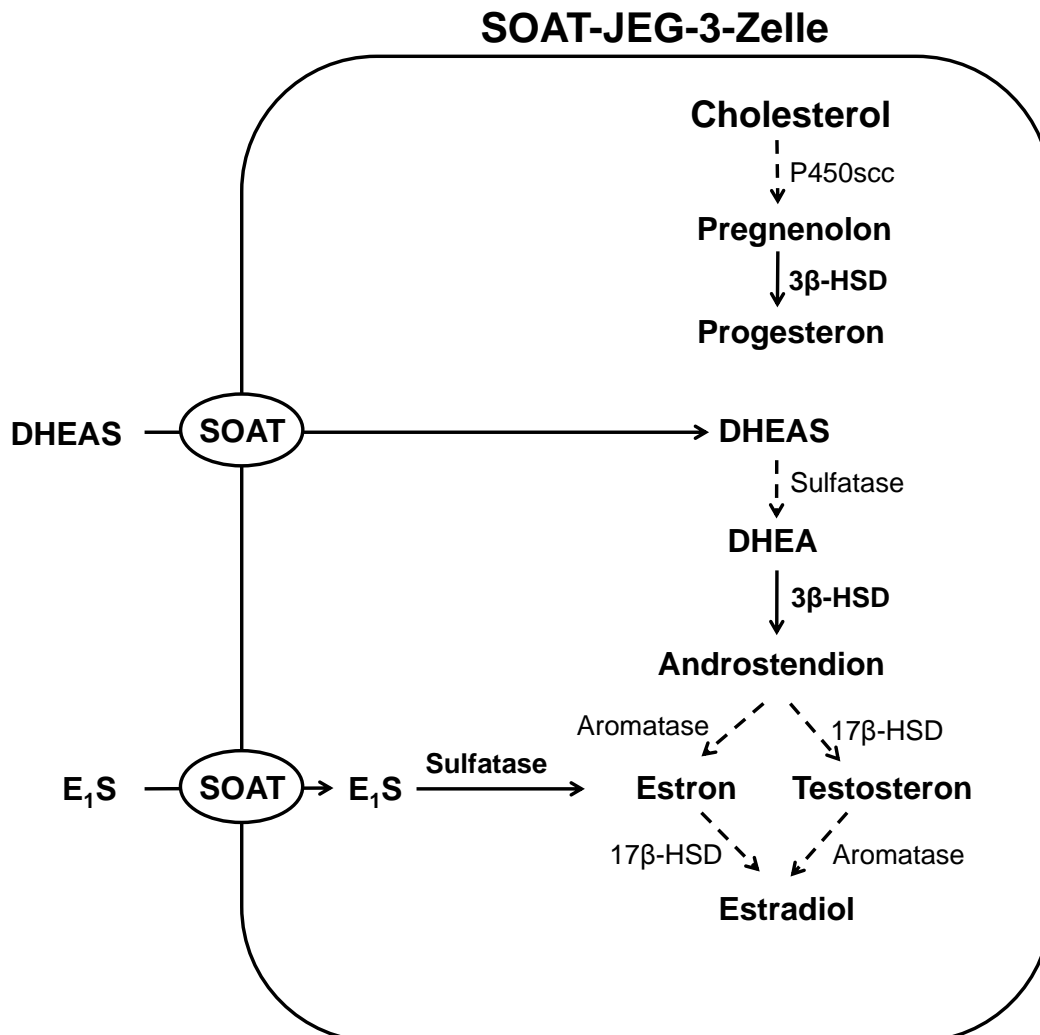


Abb. 5.4: Hypothese zur Estradiolsynthese in SOAT-JEG-3-Zellen

SOAT-JEG-3-Zellen waren nach Inkubation mit den C19-Steroiden DHEAS und DHEA nur eingeschränkt in der Lage, diese zu Estradiol zu metabolisieren. Zusätzlich war die Pregnenolon- und Progesteronsynthese stark vermindert. Aufgrund des Steroidprofils nach Inkubation mit DHEAS, DHEA oder E₁S über 24 h entsteht die Vermutung, dass bei SOAT-JEG-3 #1 die Enzyme P450_{scc}, Sulfatase, Aromatase und 17 β -HSD in ihrer Funktion eingeschränkt sind (dargestellt mit gestrichelten Pfeilen).

6. Die stabil transfizierten Zellen nahmen wie die nativen JEG-3-Zellen eine Hydroxylierung am Kohlenstoff C16 vor.

Die 16 α -Hydroxylasefähigkeit von JEG-3-Zellen und der Plazenta wird in Kapitel 5.6 diskutiert.

7. Ein Vergleich der Experimente, bei denen die Zellen mit E₁S oder DHEAS inkubiert wurden zeigt, dass die Zellen mindestens doppelt so viel des Ausgangssubstrates E₁S verbrauchten, verglichen mit dem Ausgangssubstrat DHEAS.

Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtung, dass JEG-3-Zellen E₁S besser aufnehmen als DHEAS. So war bei Transportmessungen die Aufnahme von [³H]E₁S nach 30 min noch im linearen Bereich, während sie für [³H]DHEAS bereits im Bereich der Sättigung lag (Kapitel 4.3.2). Zu berücksichtigen ist allerdings, dass E₁S zum besseren Vergleich mit DHEAS in einer Konzentration von 5 μ M eingesetzt wurde, die physiologischen Konzentrationen von E₁S während der Schwangerschaft allerdings bei maximal 500 nM liegen. Somit könnte dieser Effekt unter physiologischen Bedingungen aufgehoben sein. Untersuchungen an isolierten Zellen aus Amnion, Chorion und Dezidua zeigen, dass diese Gewebe ebenfalls E₁S hydrolysieren können und Estron und Estradiol bilden (Mitchell et al. 1984). Wie auch in JEG-3-Zellen wird E₁S in Chorion- und Deziduazellen besser hydrolysiert als DHEAS. Außerdem ist die Hydrolyseaktivität für E₁S in Chorion- und Deziduazellen aus spontanen Geburten höher als in Zellen aus Kaiserschnittgeburten. Die Autoren folgern daraus, dass die Hydrolyse von E₁S möglicherweise vor der Geburt zu einem lokalen Anstieg von Östrogenen führt, die die Kontraktilität des Myometriums beeinflussen.

8. Die Zellen konnten Estradiol sulfatieren und E₂S bilden.

Dieses Ergebnis lässt auf eine Expression von Sulfotransferasen (SULT) in JEG-3-Zellen schließen, die den Transfer von Sulfatgruppen auf andere Moleküle vornehmen. Bei JEG-3- und JEG-3-FRT-Zellen war außerdem eine Sulfatierung von DHEA zu DHEAS zu beobachten. In der Plazenta sind die Enzyme SULT2B1 und SULT1E1 im Synzytiotrophoblasten bekannt, die DHEA bzw. Estradiol sulfatieren (Raftogianis et al. 2000; Geese und Raftogianis 2001; Miki et al. 2002; He et al. 2004).

5.5.3 Bewertung der Versuchsergebnisse

Ziel der stabilen Transfektion von JEG-3-Zellen mit Steroidsulfattansportern war es, eine erhöhte Aufnahme von sulfatierten Steroiden wie DHEAS und E₁S in die Zellen hervorzurufen, die zu einer erhöhten Östrogensynthese führen sollte. Ein Vergleich der Menge synthetisierter Steroide zwischen SOAT- und OATP2B1-JEG-3-Zelllinien sollte Aufschluss über die Rolle der einzelnen Transporter für die plazentare Östrogensynthese

geben. Hierbei wäre vor allem die Inkubation mit einem Steroidmix von Interesse gewesen, der physiologische Konzentrationen der Steroidhormone beinhaltet hätte.

Obwohl JEG-3-Zellen eine geringere Transporterexpression im Vergleich zu Trophoblastenzellen aufweisen (Ugele und Simon 1999), scheinen die nativ vorhandenen Transporter ausreichend zu sein, um nach Inkubation mit 5 μ M DHEAS genug Substrat für eine maximale Östrogensynthese aufzunehmen. Um den Einfluss der verschiedenen Transporter für die plazentare Östrogensynthese sichtbar zu machen, müsste in einem nächsten Schritt die in der qRT-PCR detektierten endogen vorhandenen Transporter, insbesondere OAT4, OATP1A2 und OATP4A1, inhibiert werden. Somit ließe sich die Rolle der stabil transfizierten Transporter SOAT und OATP2B1 für die Östrogensynthese einzeln untersuchen. Wie jedoch in Kapitel 5.5.2 aufgeführt, verhielten sich die stabil transfizierten JEG-3-Zelllinien anders als erwartet und eigneten sich nicht für die weitere Verwendung. Hier sind die Gründe kurz zusammengefasst:

Die stabile Transfektion der Zellen gestaltete sich aufgrund der hohen Sensitivität gegenüber den Selektionsantibiotika als langwierig und mündete nur für die Transporter SOAT und OATP2B1, nicht aber für OAT4 in stabil transfizierten Zelllinien. Vor allem bei SOAT-JEG-3-Zellen, aber auch andeutungsweise bei OATP2B1-JEG-3-Zellen kam es jedoch im Verlauf der stabilen Transfektion zu verminderten Enzymaktivitäten, so dass die Estradiolsynthese nicht wie erwartet erhöht, sondern teilweise sogar niedriger als in den untransfizierten Kontrollzellen ausfiel. Als Ursache für die verminderten Enzymaktivitäten ist eine Beeinflussung der Genexpression durch toxische Effekte der Selektionsantibiotika vorstellbar, die bei der Generierung und Kultivierung der stabilen Zelllinien eingesetzt wurden. In der qRT-PCR zeigte SOAT-JEG-3 #1 eine höhere Expression von SOAT als Klon #2 und war dennoch nur zu einer sehr niedrigen Estradiolsynthese befähigt. Dies zeigt, dass eine hohe mRNA-Expression des stabil transfizierten Proteins kein Kriterium in JEG-3-Zellen ist, um eine Eignung für endokrinologische Untersuchungen einzuschätzen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die stabile Transfektion der Transporter SOAT und OATP2B1 in JEG-3-Zellen in unterschiedlichem Ausmaß eine eingeschränkte Steroidhormonsynthese bewirkte, so dass sich diese stabilen Zelllinien nicht für Untersuchungen der Östrogensynthese eigneten. Eine Beantwortung der initialen Fragestellung über die Rolle der einzelnen Transporter ist mit diesem Modell nicht möglich, weshalb die Versuche nach den in dieser Arbeit aufgeführten Metabolismusmessungen nicht mehr weitergeführt wurden.

5.6 16 α -Hydroxylasen in JEG-3-Zellen und der humanen Plazenta

Die Familie der CYP3A-Enzyme spielt eine wichtige Rolle bei der metabolischen Eliminierung von Medikamenten und hat zudem die größte Bedeutung bei der Hydroxylierung von DHEA(S) (Lamba et al. 2002; Miller et al. 2004). Die Hydroxylierung von DHEAS am Kohlenstoffatom C16 und die daraus resultierende 16 α -OH-DHEAS-Bildung ist eine wichtige Voraussetzung für die plazentare Bildung von Estriol (Kapitel 1.2.6; Ryan 1959a; Siiteri und MacDonald 1963; Siiteri und MacDonald 1966). Die fetale Leber stellt hierbei die Hauptquelle für 16 α -OH-DHEAS dar, dessen Bildung durch das Enzym CYP3A7 katalysiert wird (Milewich et al. 1986; Kitada et al. 1987). Dieses Enzym kommt vor allem beim Fetus vor, wurde aber auch in geringer Ausprägung in adulten Lebern identifiziert (Schuetz et al. 1993; Burk et al. 2002; Stevens et al. 2003). Das am stärksten exprimierte Enzym der CYP3A-Familie in der adulten Leber ist CYP3A4, das zwar ebenfalls Hydroxylierungen am C16 von DHEA durchführen kann, allerdings überwiegend am C7 arbeitet (Stevens et al. 2003; Miller et al. 2004). Da bei Erkrankungen mit Beeinträchtigungen des Fetus, wie der hydatiformen Mole, der Aneuploidie oder dem Down-Syndrom, die Estriolkonzentration im maternalen Blut und Urin stark vermindert sind (MacDonald und Siiteri 1964, 1965; Frandsen und Stakemann 1964; Tulchinsky et al. 1977; Newby et al. 2000), kann davon ausgegangen werden, dass die adulte Leber keinen wesentlichen Beitrag zur 16 α -OH-DHEAS-Synthese liefert und die plazentare Estriolsynthese überwiegend von fetalen Vorstufen abhängt, wie bereits durch Siiteri und MacDonald (1966) dargestellt. Die Plazenta gilt als 16 α -Hydroxylase-freies Gewebe und kann daher nicht selbst das in hohen Konzentrationen vorkommende DHEAS hydroxylieren (Milewich et al. 1986). In Plazenten aus dem ersten und dritten Trimester konnten zwar teilweise CYP3A4-7-mRNA und -Protein nachgewiesen werden, der Nachweis einer Enzymaktivität gelang bisher allerdings nicht (Schuetz et al. 1993; Hakkola et al. 1996a; Hakkola et al. 1996b).

In dieser Arbeit wurde mittels qRT-PCR eine geringe Expression von CYP3A4 und CYP3A7 in JEG-3-Zellen detektiert. Im Gegensatz zu den genannten Untersuchungen in der Plazenta haben die Enzyme in JEG-3-Zellen auch tatsächlich ihre 16 α -Hydroxylaseaktivität entfaltet, denn nach Inkubation der Zellen mit DHEAS oder DHEA wurde in den Metabolismussmessungen 16 α -OH-DHEAS bzw. 16 α -OH-DHEA im Medium detektiert (Kapitel 4.5). Eine Estriolbildung erfolgte daraus dennoch nicht; möglicherweise waren die Enzyme mit den in höheren Konzentrationen vorkommenden, nicht-16 α -hydroxylierten Substraten DHEAS und DHEA gesättigt. Zbella et al. (1986) zeigten hierzu, dass DHEAS und 16 α -OH-DHEAS bei gleichzeitiger Inkubation von JEG-3-Zellen gegenseitig ihre Umwandlung in Estradiol bzw. Estriol hemmen. Verschiedene Studien offenbarten zudem, dass die Enzyme Sulfatase und Aromatase die nicht-16 α -hydroxylierten Substrate bevorzugen. So ergaben Untersuchungen an Plazentahomogenaten und Plazentamikrosomen, dass DHEAS und

16 α -OH-DHEAS kompetitiv ihre Hydrolyse durch die Sulfatase hemmen und die Sulfatase eine ca. 7-fach höhere Affinität zu DHEAS als zu 16 α -OH-DHEAS hat. (Dibbelt und Kuss 1983). Ebenfalls hemmen die Zwischenprodukte Androstendion und 16 α -OH-Androstendion gegenseitig ihre Aromatisierung mit einer 5-12-fach höheren Affinität der Aromatase zu Androstendion als zu 16 α -OH-Androstendion (Othman und Oakey 1996). Diese unterschiedlichen Affinitäten erklären, warum in den in dieser Arbeit durchgeführten Metabolismussmessungen von JEG-3-Zellen trotz 16 α -Hydroxylierung von DHEAS und DHEA kein Estriol gebildet wurde. Bevorzugt wurden die im Überschuss vorkommenden nicht-16 α -hydroxylierten Substrate DHEAS und DHEA metabolisiert, was in einer Synthese von Estron und Estradiol mündete.

5.7 CYP17 in JEG-3-Zellen und der humanen Plazenta

5.7.1 Bisheriges Verständnis zur CYP17-Expression der Plazenta

Zusätzlich zur Synthese von Östrogenen aus DHEAS ist auch eine *de novo*-Synthese aus Cholesterol möglich, die in hormonproduzierenden Organen wie der Nebenniere und den Ovarien stattfindet (Linnemann und Kühl 2005). Cholesterol wird über das Cholesterol-*side-chain-cleavage*-Enzym P450_{scc} in Pregnenolon umgewandelt. Dieses kann über zwei Wege zur Östrogensynthese beitragen (Abb. 5.5). Der Δ^5 -Weg sieht eine Umwandlung von Pregnenolon in 17 α -OH-Pregnenolon vor, das in DHEA umgewandelt wird. Beim Δ^4 -Weg wird Pregnenolon zunächst in Progesteron, dann in 17 α -OH-Progesteron und anschließend in Androstendion umgewandelt. Von DHEA und Androstendion ausgehend erfolgt die Östrogensynthese wie bereits beschrieben (Kapitel 1.2.2). Die enzymatische Umwandlung von Pregnenolon in DHEA oder Androstendion benötigt das Enzym CYP17. Dieses ist ein bifunktionales Enzym mit einer 17 α -Hydroxylase- und einer 17,20-Lyase-Aktivität (Kuss 1994).

Es wurde lange Zeit angenommen, dass die Plazenta kein CYP17 exprimiert und daher keine Östrogene *de novo* aus Cholesterol synthetisieren kann (Siiteri und MacDonald 1966; Voutilainen und Miller 1986). Daher sei sie auf die Versorgung mit Vorstufen aus dem fetalen und maternalen Körper angewiesen, die bereits die betreffenden enzymatischen Umwandlungen durch CYP17 durchlaufen haben. DHEAS, das in sehr hohen Konzentrationen vorkommt, eignete sich als idealer Vorläufer für die plazentare Östrogensynthese (Siiteri und MacDonald 1963, 1966).

5.7.2 Neue Erkenntnisse zur CYP17-Expression

2002 berichteten Loganath et al. von der DHEA-Synthese aus Cholesterol in Plazentahomogenaten aus dem ersten Trimester. 2003 folgten Pezzi et al. mit dem Nachweis von CYP17-mRNA in der Plazenta über qRT-PCR. Die Expression war etwa 100-fach niedriger als in der Nebenniere und dem Hoden, aber vergleichbar mit der Expression in den Ovarien. Berücksichtigt man die hohe Masse der Plazenta, ergibt sich ein großes Potential für die Umwandlung von Cholesterol in Östrogene. Der Nachweis von mRNA in der Chorionkarzinomzelllinie JEG-3 ist in der Literatur recht widersprüchlich beschrieben worden. Samson et al. (2009) konnten keine CYP17-Expression nachweisen, während Steckelbroeck et al. (2004) und Escobar et al. (2011) der Nachweis gelang. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine sehr geringe Expression von CYP17 in JEG-3-Zellen mittels qRT-PCR gezeigt (Kapitel 4.3.1).

Vor allem Escobar et al. (2011) vermittelten neue Einsichten in die CYP17-Expression der Plazenta. Sie wiesen diese in primären Plazentazellen und JEG-3-Zellen nach und führten daher eine nähere Untersuchung des CYP17-Status der Plazenta durch, wo zusätzlich zur Untersuchung der mRNA-Expression das Protein in beiden Zelltypen durch Western Blot nachgewiesen wurde. Mittels immunhistochemischer Untersuchungen von Plazenten verschiedener Schwangerschaftswochen wurde das Protein im Zytoplasma von Synzytiotrophoblasten lokalisiert. Dass dieses Protein auch enzymatisch aktiv ist, zeigten Metabolismmessungen an primären Plazentazellen und JEG-3-Zellen. Hierbei war allein das im FKS enthaltene Cholesterol ausreichend, um eine Estradiolsynthese zu erzielen. Die Zugabe von 22 α -OH-Cholesterol, einer Pregnenolonvorstufe, konnte die Bildung von CYP17-Produkten in beiden Zelllinien verstärken. Dies ermöglichte die Schlussfolgerung, dass die Plazenta und JEG-3-Zellen in der Lage sind, Androgene und Östrogene *de novo* zu synthetisieren. Wie bereits erwähnt, kann Cholesterol mit Beteiligung des Enzyms CYP17 über den Δ 4- oder Δ 5-Weg in Steroidhormone umgewandelt werden (Abb. 5.5). Beim Menschen läuft die Umwandlung von 17 α -OH-Progesteron zu Androstendion jedoch nur langsam ab, so dass der Δ 5-Weg bevorzugt wird (Lin et al. 1991; Auchus et al. 1998; Flück et al. 2003). Escobar et al. (2011) maßen eine hohe Synthese von 17 α -OH-Progesteron in primären Plazentazellen und JEG-3-Zellen, allerdings keine Bildung von DHEA. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass in der Plazenta, im Gegensatz zu anderen Geweben, der Δ 4-Weg bevorzugt wird. Jedoch kann die hohe Menge an 17 α -OH-Progesteron auch aufgrund der geringen CYP17-vermittelten Umwandlung dieses Substrates zu Androstendion entstehen, so dass es zu einer Akkumulation dieses Substrates kommt. Die hohe 17 α -OH-Progesteronkonzentration in Plazentazellen kann daher auch gerade wegen des bevorzugten Δ 5-Weges zustande kommen.

Untersuchungen mit dem Proteinase K-Aktivator Forskolin identifizierten den Proteinkinase A-Signalweg als Regulator der CYP17-Expression (Escobar und Carr 2011).

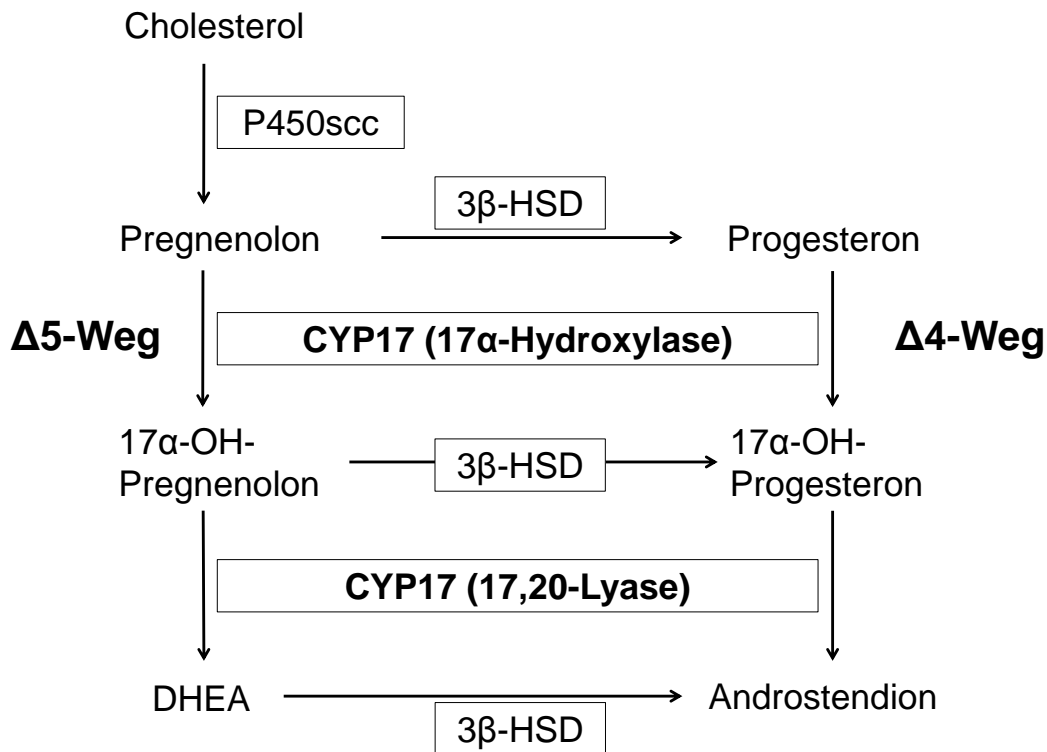


Abb. 5.5: Steroidhormonsynthese aus Cholesterol durch CYP17

Cholesterol kann auf dem $\Delta 5$ -Weg über Pregnenolon und 17α -OH-Pregnenolon in DHEA umgewandelt werden. Alternativ sieht der $\Delta 4$ -Weg eine Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron vor, das über 17α -OH-Progesteron in Androstendion umgewandelt wird. Vermittelt werden die Reaktionen von dem Enzym CYP17, das sowohl eine 17α -Hydroxylase- als auch $17,20$ -Lyase-Aktivität besitzt. Vom DHEA und Androstendion ausgehend findet die weitere Umwandlung in Östrogene wie in Abb. 1.4 beschrieben statt.

5.7.3 Rolle von CYP17 in der Plazenta

Bei kritischer Betrachtung der Ergebnisse von Escobar et al. (2011) und Vergleich mit den Messungen an JEG-3-Zellen von Bahn et al. (1981) fällt Folgendes auf: Die von primären Plazentazellen und JEG-3-Zellen gebildeten Estradiolmengen aus FKS-haltigem Medium waren bei Escobar et al. nur sehr gering und lagen im Bereich von 140 pg/mg Protein. Bahn et al. zeigten ebenfalls eine Estradiolsynthese von JEG-3-Zellen aus FKS-haltigem Medium, die im Vergleich zur Inkubation in serumfreiem Medium fast 30-fach erhöht war. Dies deutet also tatsächlich auf eine geringe Estradiolsynthese nach FKS-Inkubation hin. Allerdings lässt es nicht den Schluss zu, dass dies alleinig durch das im Medium enthaltene Cholesterol zustande kommt, da im FKS sowohl Östrogenvorstufen als auch Östrogene enthalten sind (Milo et al. 1976; Bahn et al. 1981). Bahn et al. zeigten zudem, dass eine Inkubation von JEG-3-Zellen mit DHEA oder DHEAS (<20 nM) eine wesentlich höhere Estradiolsynthese bewirkt, die 100-fach bzw. 40-fach gegenüber der Kontrolle mit serumfreiem Medium erhöht

war. Eine Inkubation mit Progesteron, 17-OH-Progesteron und 17-OH-Pregnenolon stimulierte hingegen nicht die Synthese von Estradiol. Diese Stoffe hätten zunächst durch CYP17 umgewandelt werden müssen.

Trotzdem wurde in beiden Studien eine geringe Synthese des CYP17-Metaboliten 17 α -OH-Progesteron in Plazenta- und JEG-3-Zellen nachgewiesen. Dass die Plazenta 17 α -OH-Progesteron bildet, zeigt zudem die Tatsache, dass die 17 α -OH-Progesteron-Konzentration in der Nabelvene höher als in der Nabelarterie ist, was für einen placentaren Ursprung spricht (Mathur et al. 1980; Escobar et al. 2011). Der Vergleich beider Studien lässt den Schluss zu, dass eine CYP17-Aktivität in Plazenta- und JEG-3-Zellen zwar vorhanden ist, jedoch nur sehr gering zur Östrogensynthese beiträgt, verglichen mit der Nutzung von C19-Steroiden.

Escobar et al. führen zudem das Beispiel des Sulfatasemangels an, das auf eine *de novo*-Östrogen-Synthese der Plazenta hindeutet. Wie bereits erwähnt, sind hierbei die Östrogenkonzentrationen aufgrund der mangelnden Zunutzemachung sulfatierter Steroide deutlich vermindert. Dies betrifft vor allem Estriol, da die Hauptvorstufe, das fetale 16 α -OH-DHEAS, nicht mehr umgewandelt werden kann. Die Estradiolkonzentration liegt aber immer noch bei etwa 15 % der normalen Konzentration und damit noch deutlich oberhalb der Konzentration bei Nichtschwangeren (France et al. 1973; Gips et al. 1980). Escobar et al (2011) sehen es als unwahrscheinlich an, dass diese Konzentrationen allein aus unsulfatierten Vorstufen gewonnen werden können. Ein Beitrag der Plazenta zur Östrogensynthese aus Cholesterol ist daher zu erwägen.

Das klassische Verständnis, dass die Plazenta fetale und maternale C19-Steroide zur Östrogensynthese heranzieht, wurde in der Vergangenheit mehrfach bewiesen (Ryan 1959b; Siiteri und MacDonald 1963; Bahn et al. 1981) und ist trotz der Studie von Escobar et al. der Hauptweg für die placentare Östrogensynthese. Dennoch ist der Bezug von C19-Steroiden nicht, wie bisher angenommen, der alleinige Weg für die placentare Östrogensynthese des Menschen.

Ähnlich wie beim Menschen ist auch die Plazenta des Pferdes auf die Versorgung mit C19-Steroiden angewiesen, da keine CYP17-Expression bekannt ist (Arai et al. 2006). Eine Nutzung von sulfatierten Vorstufen, wie DHEAS, für die Bildung von Östrogenen unter Nutzung des Sulfataseweges ist nicht beschrieben, könnte allerdings wie beim Menschen eine Rolle spielen. In diesem Fall wären ebenso Steroidsulfattransporter in der equinen Plazenta nötig.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die humane Plazenta bildet hohe Mengen an Östrogenen und bezieht hierzu Vorstufen aus dem fetalen und maternalen Blut. Ort der plazentaren Östrogensynthese ist der Synzytiotrophoblast, ein Synzytium, das die Chorionzotten bedeckt und den Stoffaustausch zwischen Fetus und Mutter bestimmt. Wichtige Östrogenvorläufer sind die sulfatierten Steroide Dehydroepiandrosteron-3-sulfat (DHEAS) und 16α -OH-DHEAS, die für den Zelleintritt aufgrund ihrer Sulfatgruppe auf die Aufnahme durch Transporter angewiesen sind. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der Steroidsulfattransporter SOAT (SLC10A6), OAT4 (SLC22A11) und OATP2B1 (*SLCO2B1*) für die plazentare Östrogensynthese zu untersuchen.

SOAT wurde im Synzytiotrophoblasten mit einer verstärkten Lokalisation an der apikalen Membran nachgewiesen, die im direkten Kontakt zum maternalen Blut steht. Er kann somit sulfatierte Steroide, wie DHEAS, aus dem mütterlichen Blut aufnehmen, die anschließend im Synzytiotrophoblasten zu Östrogenen metabolisiert werden. Außerdem wurde SOAT im Kapillarendothel der Chorionzotten detektiert und könnte hier die Aufnahme von DHEAS und 16α -OH-DHEAS aus dem fetalen Blut vermitteln. Beide werden in einem nächsten Schritt von den bereits in der basalen Membran des Synzytiotrophoblasten bekannten Transportern OAT4 und OATP2B1 aufgenommen und im Synzytiotrophoblasten zu Östrogenen metabolisiert.

16α -OH-DHEAS wird fast ausschließlich vom Fetus gebildet und in der Plazenta in Estriol umgewandelt. In dieser Arbeit wurde 16α -OH-DHEAS als Substrat der Transporter SOAT und OAT4 identifiziert, die wie oben beschrieben den Weg dieses Steroids aus dem fetalen Blut ins Kapillarendothel der Zotten und in den Synzytiotrophoblasten ebnen könnten.

Die Chorionkarzinomzelllinie JEG-3 wurde als Modell für die endokrinologischen Eigenschaften der Plazenta herangezogen und sollte Aufschluss über die Rolle der genannten Transporter für die plazentare Östrogensynthese geben. Hierzu wurden JEG-3-Zellen stabil mit den Transportern SOAT und OATP2B1 transfiziert. Die stabile Transfektion mit OAT4 war nicht erfolgreich. Es zeigte sich, dass die Estradiolsynthese in JEG-3-Zellen aufgrund des geschwindigkeitsbegrenzenden Enzyms Aromatase limitiert ist. Die einzelnen Transporter in den stabil transfizierten Zelllinien führten teilweise zwar zu einer erhöhten Aufnahme von DHEAS und E_1S , diese resultierte allerdings nicht in einer erhöhten Estradiolsynthese. Unerwarteterweise zeigten die stabil transfizierten SOAT-JEG-3-Zellen sogar eine verminderte Estradiolsynthese im Vergleich zu den Kontrollzellen, was auf Beeinträchtigungen von Enzymsystemen in den stabilen Zelllinien hindeutet. Dieses Modell war daher nur bedingt geeignet, um den Einfluss verschiedener Steroidsulfattransporter auf die plazentare Östrogensynthese zu untersuchen. Die Versuche offenbarten allerdings eine

16 α -Hydroxylasefähigkeit von JEG-3-Zellen gegenüber den Substraten DHEA und DHEAS, die zur Bildung von 16 α -OH-DHEA und 16 α -OH-DHEAS führte. Die Expression der entsprechenden Enzyme CYP3A4 und CYP3A7 in JEG-3-Zellen wurde in einer qRT-PCR gezeigt. Ob dieses Ergebnis auf die Plazenta übertragen werden kann, ist jedoch fraglich; eine 16 α -Hydroxylasefähigkeit konnte dort bisher noch nicht nachgewiesen werden.

7 SUMMARY

The human placenta produces high amounts of estrogens and obtains precursors from fetal and maternal blood. Placental estrogen synthesis is located in the syncytiotrophoblast, a syncytium that covers the placental villi and determines the exchange of substances between fetus and mother. Important precursors are dehydroepiandrosterone-3-sulfate (DHEAS) and 16 α -OH-DHEAS that depend on carrier-mediated uptake into cells due to their sulfate group. Aim of this project was to examine the role of the steroid sulfate carriers SOAT (SLC10A6), OAT4 (SLC22A11) and OATP2B1 (*SLCO2B1*) for placental estrogen synthesis.

SOAT was detected in the syncytiotrophoblast with an increased localization at the apical membrane that is in direct contact to maternal blood. Therefore, SOAT can mediate uptake of steroid sulfates, like DHEAS, from maternal blood that are subsequently metabolized to estrogens by the syncytiotrophoblast. Furthermore, SOAT was localized in the vascular endothelium of placental villi suggesting uptake of DHEAS and 16 α -OH-DHEAS from fetal blood. Both are consecutively taken up at the basal membrane of syncytiotrophoblasts by OAT4 and OATP2B1, which have already been localized at this side of the syncytiotrophoblast.

16 α -OH-DHEAS is almost exclusively synthesized by the fetus and metabolized to estriol by the placenta. In this study 16 α -OH-DHEAS was identified as substrate of the carriers SOAT and OAT4. Both carriers pave the way from fetal blood to vessel endothelium and syncytiotrophoblast as described above.

The choriocarcinoma cell line JEG-3 was used as a model for endocrinological traits of the placenta and was supposed to elucidate the role of the different carriers for placental estrogen synthesis. For this purpose, JEG-3 cells were stably transfected with the carriers SOAT and OATP2B1. The stable transfection with OAT4 was not successful. It was shown that estradiol synthesis by JEG-3 cells was limited due to the rate-limiting enzyme aromatase. Though transporters mediated in parts increased uptake of DHEAS and E₁S, estrogen synthesis was not increased. Unexpectedly, SOAT-JEG-3 cells even exhibited decreased estradiol synthesis compared to control cells, which suggests impaired enzyme systems in the stably transfected cell lines. Therefore, this model was only of limited suitability for examining the impact of each carrier on placental estrogen synthesis. Nevertheless, experiments revealed JEG-3 cells to hydroxylate DHEA and DHEAS to

16 α -OH-DHEA and 16 α -OH-DHEAS, respectively. Expression of the required enzymes CYP3A4 and CYP3A7 in JEG-3 cells was verified by qRT-PCR. However, if this result can be transferred to the placenta is questionable as the ability to hydroxylate carbon 16 of steroids has not yet been proven for the placenta.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Ahlin G, Hilgendorf C, Karlsson J, Szigyarto CA-K, Uhlén M, Artursson P (2009) Endogenous gene and protein expression of drug-transporting proteins in cell lines routinely used in drug discovery programs. *Drug Metab Dispos* 37:2275–83.
- Albrecht ED, Pepe GJ (1990) Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. *Endocr Rev* 11:124–50.
- Albrecht ED, Pepe GJ (2010) Estrogen regulation of placental angiogenesis and fetal ovarian development during primate pregnancy. *Int J Dev Biol* 54:397–408.
- Alcalay M, Toniolo D (1988) CpG islands of the X chromosome are gene associated. *Nucleic Acids Res* 16:9527–43.
- Ananthanarayanan M, Ng OC, Boyer JL, Suchy FJ (1994) Characterization of cloned rat liver Na(+)-bile acid cotransporter using peptide and fusion protein antibodies. *Am J Physiol* 267:G637–43.
- Arai KY, Tanaka Y, Taniyama H, Tsunoda N, Nambo Y, Nagamine N, Watanabe G, Taya K (2006) Expression of inhibins, activins, insulin-like growth factor-I and steroidogenic enzymes in the equine placenta. *Domest Anim Endocrinol* 31:19–34.
- Asif AR, Steffgen J, Metten M, Grunewald RW, Müller GA, Bahn A, Burckhardt G, Hagos Y (2005) Presence of organic anion transporters 3 (OAT3) and 4 (OAT4) in human adrenocortical cells. *Pflügers Arch* 450:88–95.
- Auchus RJ, Lee TC, Miller WL (1998) Cytochrome b5 augments the 17,20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer. *J Biol Chem* 273:3158–3165.
- Babu E, Takeda M, Narikawa S, Kobayashi Y, Enomoto A, Tojo A, Cha SH, Sekine T, Sakthisekaran D, Endou H (2002) Role of human organic anion transporter 4 in the transport of ochratoxin A. *Biochim Biophys Acta* 1590:64–75.
- Bahn RS, Worsham A, Speeg KV, Ascoli M, Rabin D (1981) Characterization of steroid production in cultured human choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 52:447–50.
- Baulieu EE (1996) Dehydroepiandrosterone (DHEA): a fountain of youth? *J Clin Endocrinol Metab* 81:3147–51.
- Baulieu EE, Fabre-Jung I, Huis in't Veld LG (1967) Dehydroepiandrosterone sulfate: a secretory product of the boar testis. *Endocrinology* 81:34–8.
- Bijsmans ITGW, Bouwmeester RAM, Geyer J, Faber KN, van de Graaf SFJ (2012) Homo- and hetero-dimeric architecture of the human liver Na⁺-dependent taurocholate co-transporting protein. *Biochem J* 441:1007–15.
- Bleasby K, Castle JC, Roberts CJ, Cheng C, Bailey WJ, Sina JF, Kulkarni AV, Hafey MJ, Evers R, Johnson JM, Ulrich RG, Slatyer JG (2006) Expression profiles of 50 xenobiotic transporter genes in humans and pre-clinical species: a resource for investigations into drug disposition. *Xenobiotica* 36:963–88.

- Bossuyt X, Müller M, Meier PJ (1996) Multispecific amphipathic substrate transport by an organic anion transporter of human liver. *J Hepatol* 25:733–8.
- Branchaud CL, Goodyer CG, Lipowski LS (1983) Progesterone and estrogen production by placental monolayer cultures: effect of dehydroepiandrosterone and luteinizing hormone-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 56:761–6.
- Breckwoldt M (2008) Spezielle Untersuchungsmethoden in der Geburtshilfe. In: Breckwoldt M, Kaufmann M, Pfeleiderer A (Hrsg.) *Gynäkologie und Geburtshilfe*, 5. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart, S. 318–330, ISBN 978-3-13-118905-9.
- Breckwoldt M, Karck U (2008) Plazenta. In: Breckwoldt M, Kaufmann M, Pfeleiderer A (Hrsg.) *Gynäkologie und Geburtshilfe*, 5. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart, S. 299–304, ISBN 978-3-13-118905-9.
- Bronger H, König J, Kopplow K, Steiner H-H, Ahmadi R, Herold-Mende C, Keppler D, Nies AT (2005) ABC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier. *Cancer Res* 65:11419–28.
- Bukovsky A, Caudle MR, Cekanova M, Fernando RI, Wimalasena J, Foster JS, Henley DC, Elder RF (2003) Placental expression of estrogen receptor beta and its hormone binding variant-comparison with estrogen receptor alpha and a role for estrogen receptors in asymmetric division and differentiation of estrogen-dependent cells. *Reprod Biol Endocrinol* 1:36.
- Burckhardt G (2012) Drug transport by Organic Anion Transporters (OATs). *Pharmacol Ther* 136:106–30.
- Burk O, Tegude H, Koch I, Hustert E, Wolbold R, Glaeser H, Klein K, Fromm MF, Nuessler AK, Neuhaus P, Zanger UM, Eichelbaum M, Wojnowski L (2002) Molecular mechanisms of polymorphic CYP3A7 expression in adult human liver and intestine. *J Biol Chem* 277:24280–8.
- Cha SH, Sekine T, Kusuhashi H, Yu E, Kim JY, Kim DK, Sugiyama Y, Kanai Y, Endou H (2000) Molecular cloning and characterization of multispecific organic anion transporter 4 expressed in the placenta. *J Biol Chem* 275:4507–12.
- Christie DM, Dawson PA, Thevananther S, Shneider BL (1996) Comparative analysis of the ontogeny of a sodium-dependent bile acid transporter in rat kidney and ileum. *Am J Physiol* 271:G377–85.
- Claro da Silva T, Polli JE, Swaan PW (2013) The solute carrier family 10 (SLC10): beyond bile acid transport. *Mol Aspects Med* 34:252–69.
- Claus R, Hoffmann B (1980) Oestrogens, compared to other steroids of testicular origin, in blood plasma of boars. *Acta Endocrinol (Copenh)* 94:404–11.
- Coelingh Bennink HJT (2004) Are all estrogens the same? *Maturitas* 47:269–75.
- Conley AJ, Head JR, Stirling DT, Mason JI (1992) Expression of steroidogenic enzymes in the bovine placenta and fetal adrenal glands throughout gestation. *Endocrinology* 130:2641–50.

- Conley AJ, Rainey WE, Mason JI (1994) Ontogeny of steroidogenic enzyme expression in the porcine conceptus. *J Mol Endocrinol* 12:155–65.
- Coombes RC, Cardoso F, Isambert N, Lesimple T, Soulié P, Peraire C, Fohanno V, Kornowski A, Ali T, Schmid P (2013) A phase I dose escalation study to determine the optimal biological dose of irosustat, an oral steroid sulfatase inhibitor, in postmenopausal women with estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 73–82.
- Craddock AL, Love MW, Daniel RW, Kirby LC, Walters HC, Wong MH, Dawson PA (1998) Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am J Physiol* 274:G157–69.
- Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson J-A (2006) International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev* 58:773–81.
- Dawson PA, Haywood J, Craddock AL, Wilson M, Tietjen M, Kluckman K, Maeda N, Parks JS (2003) Targeted deletion of the ileal bile acid transporter eliminates enterohepatic cycling of bile acids in mice. *J Biol Chem* 278:33920–7.
- Van der Deure WM, Peeters RP, Visser TJ (2010) Molecular aspects of thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and OATPs, and the effects of genetic variation in these transporters. *J Mol Endocrinol* 44:1–11.
- Deutsche Krebshilfe e.V. (2014) Brustkrebs. <http://www.krebshilfe.de/wir-informieren/ueber-krebs/haeufige-krebsarten/brustkrebs.html>. Stand: 25.02.2014.
- Dibbelt L, Herzog V, Kuss E (1989) Human placental steryl sulfatase: immunocytochemical and biochemical localization. *Biol Chem Hoppe Seyler* 370:1093–102.
- Dibbelt L, Kuss E (1983) Human placental steroid-sulfatase. Kinetics of the in-vitro hydrolysis of dehydroepiandrosterone 3-sulfate and of 16 alpha-hydroxydehydroepiandrosterone 3-sulfate. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 364:187–91.
- Dibbelt L, Nagel H, Knuppen R, Ugele B, Kuss E (1994) Steryl sulfatase expression in normal and transformed human placental cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 49:167–71.
- Diczfalusy E (1964) Endocrine functions of the human fetoplacental unit. *Fed Proc* 23:791–8.
- Döcke F (1994) Graviditätsbedingte Östrogenproduktion und Angaben zur Ausbildung einer fetoplazentären Einheit. In: Döcke F (Hrsg.) *Veterinärmedizinische Endokrinologie*, 3., völlig überarbeitete und erweiterte Auflage. Gustav Fischer Verlag, Jena, S. 519–526, ISBN 3-334-60432-2.
- Döring B (2010) Molekulare und funktionelle Charakterisierung des humanen Sodium-dependent Organic Anion Transporters (SOAT), Dissertation am Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen. VVB Lauferweiler Verlag, Gießen, ISBN 978-3-8359-5592-9.
- Döring B, Lütke T, Geyer J, Petzinger E (2012) The SLC10 carrier family: transport functions and molecular structure. *Curr Top Membr* 70:105–68.

- Edqvist LE, Johansson ED, Kasström H, Olsson SE, Richkind M (1975) Blood plasma levels of progesterone and oestradiol in the dog during the oestrous cycle and pregnancy. *Acta Endocrinol (Copenh)* 78:554–64.
- Ekaratanawong S, Anzai N, Jutabha P, Miyazaki H, Noshiro R, Takeda M, Kanai Y, Sophasan S, Endou H (2004) Human organic anion transporter 4 is a renal apical organic anion/dicarboxylate exchanger in the proximal tubules. *J Pharmacol Sci* 94:297–304.
- Elias PM, Crumrine D, Rassner U, Hachem J-P, Menon GK, Man W, Choy MHW, Leypoldt L, Feingold KR, Williams ML (2004) Basis for abnormal desquamation and permeability barrier dysfunction in RXLI. *J Invest Dermatol* 122:314–9.
- De Escobar GM, Obregón MJ, del Rey FE (2004) Maternal thyroid hormones early in pregnancy and fetal brain development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 18:225–48.
- Escobar JC, Carr BR (2011) The protein kinase A pathway regulates CYP17 expression and androgen production in the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 96:2869–73.
- Escobar JC, Patel SS, Beshay VE, Suzuki T, Carr BR (2011) The human placenta expresses CYP17 and generates androgens de novo. *J Clin Endocrinol Metab* 96:1385–92.
- Fernandes CF, Godoy JR, Döring B, Cavalcanti MCO, Bergmann M, Petzinger E, Geyer J (2007) The novel putative bile acid transporter SLC10A5 is highly expressed in liver and kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 361:26–32.
- Fietz D, Bakhaus K, Wapelhorst B, Grosser G, Günther S, Alber J, Döring B, Kliesch S, Weidner W, Galuska CE, Hartmann MF, Wudy SA, Bergmann M, Geyer J (2013) Membrane transporters for sulfated steroids in the human testis - cellular localization, expression pattern and functional analysis. *PLoS One* 8:e62638.
- Flück CE, Miller WL, Auchus RJ (2003) The 17, 20-lyase activity of cytochrome p450c17 from human fetal testis favors the delta 5 steroidogenic pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3762–6.
- Fowden AL, Forhead AJ, Ousey JC (2008) The Endocrinology of equine parturition. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 116:393–403.
- France JT, Seddon RJ, Liggins GC (1973) A study of pregnancy with low estrogen production due to placental sulfatase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 36:1–9.
- Frandsen VA, Stakemann G (1964) The site of production of oestrogenic hormones in human pregnancy.III Further observations on the hormone excretion in pregnancy with anencephalic foetus. *Acta Endocrinol (Copenh)* 47:265–76.
- Fujino H, Saito T, Ogawa S-I, Kojima J (2005) Transporter-mediated influx and efflux mechanisms of pitavastatin, a new inhibitor of HMG-CoA reductase. *J Pharm Pharmacol* 57:1305–11.
- Fujiwara K, Adachi H, Nishio T, Unno M, Tokui T, Okabe M, Onogawa T, Suzuki T, Asano N, Tanemoto M, Seki M, Shiiba K, Suzuki M, Kondo Y, Nunoki K, Shimosegawa T, Iinuma K, Ito S, Matsuno S, Abe T (2001) Identification of thyroid hormone transporters in humans: different molecules are involved in a tissue-specific manner. *Endocrinology* 142:2005–12.

- Funk K (2009) Die Bedeutung des Sodium-dependent Organic Anion Transporters (SOAT) für den Steroidsulfattransport in der Plazenta und die Pathogenese hormonabhängiger Mammakarzinome, Dissertation am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. VVB Laufersweiler Verlag, Gießen, ISBN 3-8359-5414-8.
- Galuska CE, Hartmann MF, Sánchez-Guijo A, Bakhaus K, Geyer J, Schuler G, Zimmer K-P, Wudy SA (2013) Profiling intact steroid sulfates and unconjugated steroids in biological fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Analyst* 138:3792–801.
- Gao B, Huber RD, Wenzel A, Vavricka SR, Ismail MG, Remé C, Meier PJ (2005) Localization of organic anion transporting polypeptides in the rat and human ciliary body epithelium. *Exp Eye Res* 80:61–72.
- Gassmann M, Lutz TA (2005) Funktion des Blutes. In: von Engelhardt W, Breves G (Hrsg.) *Physiologie der Haustiere*, 2. Auflage. Enke Verlag, Stuttgart, S. 193–198, ISBN 3-8304-1039-5
- Geese WJ, Raftogianis RB (2001) Biochemical characterization and tissue distribution of human SULT2B1. *Biochem Biophys Res Commun* 288:280–9.
- Geyer J, Döring B, Meerkamp K, Ugele B, Bakhiya N, Fernandes CF, Godoy JR, Glatt H, Petzinger E (2007) Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6). *J Biol Chem* 282:19728–41.
- Geyer J, Fernandes CF, Döring B, Burger S, Godoy JR, Rafalzik S, Hübschle T, Gerstberger R, Petzinger E (2008) Cloning and molecular characterization of the orphan carrier protein Slc10a4: expression in cholinergic neurons of the rat central nervous system. *Neuroscience* 152:990–1005.
- Geyer J, Godoy JR, Petzinger E (2004) Identification of a sodium-dependent organic anion transporter from rat adrenal gland. *Biochem Biophys Res Commun* 316:300–6.
- Gibb W, Challis JRG (2006) Human parturition and birth: regulation. eLS. doi: 10.1038/npg.els.0002140.
- Gibb W, Lavoie JC (1984) Kinetic studies on the formation of estrogens from dehydroepiandrosterone sulfate by human placental microsomes. *Endocrinology* 114:2323–9.
- Gips H, Bailer P, Korte K (1980) Placental steroid metabolism in a case of placental sulfatase deficiency. *J Endocrinol Invest* 3:51–8.
- Godoy JR, Fernandes C, Döring B, Beuerlein K, Petzinger E, Geyer J (2007) Molecular and phylogenetic characterization of a novel putative membrane transporter (SLC10A7), conserved in vertebrates and bacteria. *Eur J Cell Biol* 86:445–60.
- Goldenberg RL, Goepfert AR, Ramsey PS (2005) Biochemical markers for the prediction of preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 192:S36–46.
- Goodwin TM (1999) A role for estriol in human labor, term and preterm. *Am J Obstet Gynecol* 180:S208–13.

- Gräf KJ (1978) Serum oestrogen, progesterone and prolactin concentrations in cyclic, pregnant and lactating beagle dogs. *J Reprod Fertil* 52:9–14.
- Greupink R, Dillen L, Monshouwer M, Huisman MT, Russel FGM (2011) Interaction of fluvastatin with the liver-specific Na⁺-dependent taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *Eur J Pharm Sci* 44:487–96.
- Grimley Evans J, Malouf R, Huppert F, van Niekerk JK (2006) Dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation for cognitive function in healthy elderly people. *Cochrane database Syst Rev* CD006221.
- Grimshaw RN, Mitchell BF, Challis JR (1983) Steroid modulation of pregnenolone to progesterone conversion by human placental cells in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 145:234–8.
- Grosser G (2013) Der Sodium-dependent Organic Anion Transporter SOAT: Gewebeexpression, vergleichende funktionelle Charakterisierung und Generierung einer 3D-QSAR Pharmakophore, Dissertation am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. VVB Lauferweiler Verlag, Gießen, ISBN 978-3-8359-5990-3.
- Grosser G, Fietz D, Günther S, Bakhaus K, Schweigmann H, Ugele B, Brehm R, Petzinger E, Bergmann M, Geyer J (2013) Cloning and functional characterization of the mouse sodium-dependent organic anion transporter Soat (Slc10a6). *J Steroid Biochem Mol Biol* 138C:90–99.
- Grube M, Köck K, Karner S, Reuther S, Ritter CA, Jedlitschky G, Kroemer HK (2006a) Modification of OATP2B1-mediated transport by steroid hormones. *Mol Pharmacol* 70:1735–1741.
- Grube M, Köck K, Oswald S, Draber K, Meissner K, Eckel L, Böhm M, Felix SB, Vogelgesang S, Jedlitschky G, Siegmund W, Warzok R, Kroemer HK (2006b) Organic anion transporting polypeptide 2B1 is a high-affinity transporter for atorvastatin and is expressed in the human heart. *Clin Pharmacol Ther* 80:607–20.
- Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG (2004) Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res* 114:397–407.
- Haddow JE, Palomaki GE, Allan WC, Williams JR, Knight GJ, Gagnon J, O’Heir CE, Mitchell ML, Hermos RJ, Waisbren SE, Faix JD, Klein RZ (1999) Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *N Engl J Med* 341:549–55.
- Hagenbuch B, Meier PJ (2004) Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 447:653–65.
- Hagenbuch B, Stieger B (2013) The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. *Mol Aspects Med* 34:396–412.
- Hagos Y, Bahn A, Vormfelde SV, Brockmöller J, Burckhardt G (2007a) Torasemide transport by organic anion transporters contributes to hyperuricemia. *J Am Soc Nephrol* 18:3101–9.

- Hagos Y, Stein D, Ugele B, Burckhardt G, Bahn A (2007b) Human renal organic anion transporter 4 operates as an asymmetric urate transporter. *J Am Soc Nephrol* 18:430–9.
- Hakkola J, Pasanen M, Hukkanen J, Pelkonen O, Mäenpää J, Edwards RJ, Boobis AR, Raunio H (1996a) Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 forms in human full-term placenta. *Biochem Pharmacol* 51:403–11.
- Hakkola J, Raunio H, Purkunen R, Pelkonen O, Saarikoski S, Cresteil T, Pasanen M (1996b) Detection of cytochrome P450 gene expression in human placenta in first trimester of pregnancy. *Biochem Pharmacol* 52:379–83.
- Haller U (1999) Maligne Trophoblasttumoren. In: Bender HG, Diedrich K, Künzel W (Hrsg.) *Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Allgemeine gynäkologische Onkologie*, 4. Auflage. Urban & Schwarzenberg, Kösel, Kempten, S. 204–208, ISBN 3-541-15104-8.
- Harada N, Ogawa H, Shozu M, Yamada K, Suhara K, Nishida E, Takagi Y (1992) Biochemical and molecular genetic analyses on placental aromatase (P-450AROM) deficiency. *J Biol Chem* 267:4781–5.
- He D, Meloche CA, Dumas NA, Frost AR, Falany CN (2004) Different subcellular localization of sulphotransferase 2B1b in human placenta and prostate. *Biochem J* 379:533–40.
- Hernández-Martín A, González-Sarmiento R, De Unamuno P (1999) X-linked ichthyosis: an update. *Br J Dermatol* 141:617–27.
- Hertz R (1959) Choriocarcinoma of women maintained in serial passage in hamster and rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 102:77–81.
- Hill M, Pařízek A, Cibula D, Kancheva R, Jirásek JE, Jirkovská M, Velíková M, Kubátová J, Klímková M, Pašková A, Zizka Z, Kancheva L, Kazihnitková H, Zamrazilová L, Stárka L (2010a) Steroid metabolome in fetal and maternal body fluids in human late pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 122:114–32.
- Hill M, Pařízek A, Jirásek JE, Jirkovská M, Velíková M, Dusková M, Klímková M, Pašková A, Zizka Z, Germanová A, Koucký M, Kalousová M, Stárka L (2010b) Is maternal progesterone actually independent of the fetal steroids? *Physiol Res* 59:211–24.
- Hill M, Pašková A, Kancheva R, Velíková M, Kubátová J, Kancheva L, Adamcová K, Mikešová M, Zizka Z, Koucký M, Sarpatková H, Kačer V, Matucha P, Meloun M, Pařízek A (2014) Steroid profiling in pregnancy: A focus on the human fetus. *J Steroid Biochem Mol Biol* 139:201–22.
- Ho RH, Tirona RG, Leake BF, Glaeser H, Lee W, Lemke CJ, Wang Y, Kim RB (2006) Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression, and pharmacogenetics. *Gastroenterology* 130:1793–806.
- Hoffmann B, Gentz F, Failing K (1996) Investigations into the course of progesterone-, oestrogen- and eCG-concentrations during normal and impaired pregnancy in the mare. *Reprod Domest Anim* 31:717–723.
- Hoffmann B, Goes de Pinho T, Schuler G (1997) Determination of free and conjugated oestrogens in peripheral blood plasma, feces and urine of cattle throughout pregnancy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105:296–303.

- Hoffmann B, Höveler R, Nohr B, Hasan SH (1994) Investigations on hormonal changes around parturition in the dog and the occurrence of pregnancy-specific non conjugated oestrogens. *Exp Clin Endocrinol* 102:185–9.
- Hoffmann B, Rostalski A, Mutembei HM, Goericke-Pesch S (2010) Testicular steroid hormone secretion in the boar and expression of testicular and epididymal steroid sulphatase and estrogen sulphotransferase activity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 118:274–80.
- Hoffmann B, Schuler G (2002) The bovine placenta; a source and target of steroid hormones: observations during the second half of gestation. *Domest Anim Endocrinol* 23:309–20.
- Holinka CF, Diczfalusy E, Coelingh Bennink HJT (2008) Estetrol: a unique steroid in human pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 110:138–43.
- Honjo H, Kitawaki J, Itoh M, Yasuda J, Yamamoto T, Okada H, Ohkubo T, Nambara T (1986) Serum and urinary oestrone sulphate in pregnancy and delivery measured by a direct radioimmunoassay. *Acta Endocrinol (Copenh)* 112:423–30.
- Hooper DC, Scott GS, Zborek A, Mikheeva T, Kean RB, Koprowski H, Spitsin S V (2000) Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB J* 14:691–8.
- Hruz P, Zimmermann C, Gutmann H, Degen L, Beuers U, Terracciano L, Drewe J, Beglinger C (2006) Adaptive regulation of the ileal apical sodium dependent bile acid transporter (ASBT) in patients with obstructive cholestasis. *Gut* 55:395–402.
- Huuskonen P, Myllynen P, Storvik M, Pasanen M (2013) The effects of aflatoxin B1 on transporters and steroid metabolizing enzymes in JEG-3 cells. *Toxicol Lett* 218:200–6.
- Invitrogen - Handbuch pcDNA5/FRT/TO (2010) pcDNA5/FRT/TO Inducible expression vector designed for use with the Flp-In T-REx System.
http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pcdna5frrto_man.pdf. Stand: 25.02.2014.
- Invitrogen - Handbuch pFRT/lacZeo (2002) pFRT/lacZeo Flp recombination target site vector designed for use with the Flp-In System.
http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/flpin_pfrrtlaczeo_man.pdf. Stand: 25.02.2014.
- Junqueira LC, Carneiro J (1996) Schwangerschaft. In: Junqueira LC, Carneiro J (Hrsg.) *Histologie*, 4. Auflage. Springer-Verlag, Heidelberg, S. 605–619, ISBN 3-540-60404-9.
- Karakus E (2009) Die Bedeutung des Transporters SOAT (SLC10A6) für die Entwicklung von Estrogen-abhängigen Mammakarzinomen, Dissertation am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. VVB Lauferweiler Verlag, Gießen, ISBN 3-8359-5429-6.
- Katzenellenbogen BS (1984) Biology and receptor interactions of estriol and estriol derivatives in vitro and in vivo. *J Steroid Biochem* 20:1033–7.
- Kilby MD, Verhaeg J, Gittoes N, Somerset DA, Clark PM, Franklyn JA (1998) Circulating thyroid hormone concentrations and placental thyroid hormone receptor expression in

- normal human pregnancy and pregnancy complicated by intrauterine growth restriction (IUGR). *J Clin Endocrinol Metab* 83:2964–71.
- Kimura H, Takeda M, Narikawa S, Enomoto A, Ichida K, Endou H (2002) Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal transport of prostaglandins. *J Pharmacol Exp Ther* 301:293–8.
- Kitada M, Kamataki T, Itahashi K, Rikihisa T, Kanakubo Y (1987) P-450 HFLa, a form of cytochrome P-450 purified from human fetal livers, is the 16 alpha-hydroxylase of dehydroepiandrosterone 3-sulfate. *J Biol Chem* 262:13534–7.
- Kleinstein J, Gips H (2000) Die Endokrinologie und Biochemie von Fetus und Plazenta. In: Künzel W, Bender HG, Diedrich K (Hrsg.) *Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Schwangerschaft I*, 4. Auflage. Urban & Fischer Verlag, München, Jena, S. 77–87, ISBN 3-437-21890-5.
- Knauer MJ, Urquhart BL, Meyer zu Schwabedissen HE, Schwarz UI, Lemke CJ, Leake BF, Kim RB, Tirona RG (2010) Human skeletal muscle drug transporters determine local exposure and toxicity of statins. *Circ Res* 106:297–306.
- Kobayashi D, Nozawa T, Imai K, Nezu J, Tsuji A, Tamai I (2003) Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane. *J Pharmacol Exp Ther* 306:703–8.
- Koepsell H (2013) The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Mol Aspects Med* 34:413–35.
- Kohler PO, Bridson WE (1971) Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 32:683–7.
- Kohler PO, Bridson WE, Hammond JM, Weintraub B, Kirschner MA, Van Thiel DH (1971) Clonal lines of human choriocarcinoma cells in culture. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 153:137–53.
- Kojima S, Yanaihara T, Nakayama T (1981) Serum steroid levels in children at birth and in early neonatal period. *Am J Obstet Gynecol* 140:961–5.
- König A, Döring B, Mohr C, Geipel A, Geyer J, Glebe D (2014) Kinetics of the bile acid transporter and hepatitis B virus receptor Na(+)/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) in hepatocytes. *J. Hepatol.* doi: 10.1016/j.jhep.2014.05.018.
- Kota SK, Gayatri K, Jammula S, Kota SK, Krishna SVS, Meher LK, Modi KD (2013) Endocrinology of parturition. *Indian J Endocrinol Metab* 17:50–9.
- Kuijper EAM, Ket JCF, Caanen MR, Lambalk CB (2013) Reproductive hormone concentrations in pregnancy and neonates: a systematic review. *Reprod Biomed Online* 27:33–63.
- Kullak-Ublick GA, Fisch T, Oswald M, Hagenbuch B, Meier PJ, Beuers U, Paumgartner G (1998) Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS): identification of a carrier protein in human liver and brain. *FEBS Lett* 424:173–6.
- Kullak-Ublick GA, Glasa J, Böker C, Oswald M, Grützner U, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ, Beuers U, Kramer W, Wess G, Paumgartner G (1997) Chlorambucil-taurocholate is

- transported by bile acid carriers expressed in human hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology* 113:1295–305.
- Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ, Hagenbuch B (2001) Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 120:525–533.
- Kuss E (1994) The fetoplacental unit of primates. *Exp Clin Endocrinol* 102:135–65.
- Laatikainen T, Laitinen EA, Vihko R (1971) Secretion of free and sulfate-conjugated neutral steroids by the human testis. Effect of administration of human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 32:59–64.
- Laatikainen T, Pelkonen J, Apter D, Ranta T (1980) Fetal and maternal serum levels of steroid sulfates, unconjugated steroids, and prolactin at term pregnancy and in early spontaneous labor. *J Clin Endocrinol Metab* 50:489–94.
- Labrie F (1991) Intracrinology. *Mol Cell Endocrinol* 78:C113–8.
- Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Simard J (2001) DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. *Front Neuroendocrinol* 22:185–212.
- Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE (2002) Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 54:1271–94.
- Lee W, Glaeser H, Smith LH, Roberts RL, Moeckel GW, Gervasini G, Leake BF, Kim RB (2005) Polymorphisms in human organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2): implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry. *J Biol Chem* 280:9610–7.
- Leuthold S, Hagenbuch B, Mohebbi N, Wagner CA, Meier PJ, Stieger B (2009) Mechanisms of pH-gradient driven transport mediated by organic anion polypeptide transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* 296:C570–82.
- Li L, Lee TK, Meier PJ (1998) Identification of glutathione as a driving force and leukotriene C4 as a substrate for oatp1, the hepatic sinusoidal organic solute transporter. *J Biol Chem* 273:16184–16191.
- Li L, Meier PJ, Ballatori N (2000) Oatp2 mediates bidirectional organic solute transport: a role for intracellular glutathione. *Mol Pharmacol* 58:335–40.
- Life Technologies - Handbuch Flp-In System (2013) Flp-In-System: For Generating Constitutive Expression Cell Lines, Protokoll.
<http://www.lifetechnologies.com/us/en/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/protein-expression-protocol/flip-in-system-for-generating-constitutive-expression-cell-lines.html>. Stand: 25.02.2014.
- Life Technologies - Handbuch pcDNA5/FRT (2012) pcDNA5/FRT Vector - Expression vector designed for use with the Flp-In System.
http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/flpin_pcdna5frt_man.pdf. Stand: 25.02.2014.

- Life Technologies - Handbuch pOG44 (2012) pOG44 - Flp-recombinase expression vector designed for use with the Flp-In System.
http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/flpin_pog44_man.pdf. Stand: 25.02.2014.
- Lin D, Harikrishna JA, Moore CCD, Jones KL, Miller WL (1991) Missense mutation serine 106 - proline causes 17 alpha-hydroxylase deficiency. *J Biol Chem* 266:15992–8.
- Linnemann M, Kühl M (2005) Hormone der Keimdrüsen und der Plazenta. In: Linnemann M, Kühl M (Hrsg.) *Biochemie für Mediziner - Ein Lehr- und Arbeitsbuch mit klinischem Bezug*, 7. Auflage. Springer-Verlag, Heidelberg, S. 627–648, ISBN 3-540-21176-4.
- Loganath A, Peh KL, Wong PC (2002) Evidence for the biosynthesis of DHEA from cholesterol by first-trimester human placental tissue: source of androgens. *Horm Metab Res* 34:116–20.
- Loubière LS, Vasilopoulou E, Bulmer JN, Taylor PM, Stieger B, Verrey F, McCabe CJ, Franklyn JA, Kilby MD, Chan S-Y (2010) Expression of thyroid hormone transporters in the human placenta and changes associated with intrauterine growth restriction. *Placenta* 31:295–304.
- MacDonald PC, Siiteri PK (1964) Study of estrogen production in women with hydatiform mole. *J Clin Endocrinol Metab* 24:685–90.
- MacDonald PC, Siiteri PK (1965) Origin of estrogen in women pregnant with an anencephalic fetus. *J Clin Invest* 44:465–74.
- Marin JJ, Serrano MA, El-Mir MY, Eleno N, Boyd CA (1990) Bile acid transport by basal membrane vesicles of human term placental trophoblast. *Gastroenterology* 99:1431–8.
- Mathur RS, Landgrebe S, Moody LO, Powell S, Williamson HO (1980) Plasma steroid concentrations in maternal and umbilical circulation after spontaneous onset of labor. *J Clin Endocrinol Metab* 51:1235–8.
- McGregor JA, Jackson GM, Lachelin GC, Goodwin TM, Artal R, Hastings C, Dullien V (1995) Salivary estriol as risk assessment for preterm labor: a prospective trial. *Am J Obstet Gynecol* 173:1337–42.
- Miki Y, Nakata T, Suzuki T, Darnel AD, Moriya T, Kaneko C, Hidaka K, Shiotsu Y, Kusaka H, Sasano H (2002) Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human adult and fetal tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5760–8.
- Milewich L, MacDonald PC, Carr BR (1986) Estrogen 16 alpha-hydroxylase activity in human fetal tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 63:404–406.
- Miller KKM, Cai J, Ripp SL, Pierce WM, Rushmore TH, Prough RA (2004) Stereo- and regioselectivity account for the diversity of dehydroepiandrosterone (DHEA) metabolites produced by liver microsomal cytochromes P450. *Drug Metab Dispos* 32:305–13.
- Milo GE, Malarkey WB, Powell JE, Blakeslee JR, Yohn DS (1976) Effects of steroid hormones in fetal bovine serum on plating and cloning of human cells in vitro. *In Vitro* 12:23–30.

- Miny P, Holzgreve W (2000) Genetische Erkrankungen. In: Diedrich K, Holzgreve W, Jonat W, et al. (Hrsg.) Gynäkologie und Geburtshilfe, 1. Auflage. Springer-Verlag, Heidelberg, S. 260–277, ISBN 3-540-65258-2.
- Mitchell BF, Cross J, Hobkirk R, Challis JR (1984) Formation of unconjugated estrogens from estrone sulfate by dispersed cells from human fetal membranes and decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 58:845–9.
- Mutembei HM, Kowalewski MP, Ugele B, Schuler G, Hoffmann B (2009) Expression and activity of steroid sulphotase in the boar testis. *Reprod Domest Anim* 44:17–23.
- Nett TM, Akbar AM, Phemister RD, Holst PA, Reichert LE, Niswender GD (1975) Levels of lutenizing hormone, estradiol and progesterone in serum during the estrous cycle and pregnancy in the beagle bitch (38491). *Proc Soc Exp Biol Med* 148:134–9.
- Newby D, Aitken DA, Howatson AG, Connor JM (2000) Placental synthesis of oestriol in Down's syndrome pregnancies. *Placenta* 21:263–7.
- Nishimura M, Naito S (2005) Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 20:452–77.
- Nishiyama T, Tsumagari S, Ito M, Kimura J, Watanabe G, Taya K, Takeishi M (1999) Immunohistochemical study of steroidogenic enzymes in the ovary and placenta during pregnancy in the dog. *Anat Histol Embryol* 28:125–9.
- Nozawa T, Imai K, Nezu J-I, Tsuji A, Tamai I (2004) Functional characterization of pH-sensitive organic anion transporting polypeptide OATP-B in human. *J Pharmacol Exp Ther* 308:438–45.
- Osathanondh R, Canick J, Ryan KJ, Tulchinsky D (1976) Placental sulfatase deficiency: a case study. *J Clin Endocrinol Metab* 43:208–14.
- Othman YS, Oakey RE (1996) Why so much oestriol? A comparison of the aromatisation of androstenedione and 16 alpha-hydroxyandrostenedione when incubated alone or together with human placental microsomes. *J Endocrinol* 148:399–407.
- Palmieri C, Patten DK, Januszewski A, Zucchini G, Howell SJ (2013) Breast cancer: Current and future endocrine therapies. *Mol Cell Endocrinol* 382:695–723.
- Pashen RL, Allen WR (1979) The role of the fetal gonads and placenta in steroid production, maintenance of pregnancy and parturition in the mare. *J Reprod Fertil Suppl* 499–509.
- Pasqualini JR (2005) Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97:401–15.
- Pasqualini JR (2004) The selective estrogen enzyme modulators in breast cancer: a review. *Biochim Biophys Acta* 1654:123–43.
- Patel P, Weerasekera N, Hitchins M, Boyd CAR, Johnston DG, Williamson C (2003) Semi quantitative expression analysis of MDR3, FIC1, BSEP, OATP-A, OATP-C, OATP-D, OATP-E and NTCP gene transcripts in 1st and 3rd trimester human placenta. *Placenta* 24:39–44.

- Pepe GJ, Albrecht ED (1995) Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. *Endocr Rev* 16:608–48.
- Pepe GJ, Albrecht ED (1999) Regulation of functional differentiation of the placental villous syncytiotrophoblast by estrogen during primate pregnancy. *Steroids* 64:624–7.
- De Peretti E, Mappus E (1983) Pattern of plasma pregnenolone sulfate levels in humans from birth to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 57:550–6.
- Pezzi V, Mathis JM, Rainey WE, Carr BR (2003) Profiling transcript levels for steroidogenic enzymes in fetal tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 87:181–189.
- Pfisterer J (2000) Maligne Tumoren der Tuben. In: Diedrich K, Holzgreve W, Jonat W, Schneider KTM, Weiss JM (Hrsg.) *Gynäkologie und Geburtshilfe*, 1. Auflage. Springer-Verlag, Heidelberg, S. 611–619, ISBN 3-540-65258-2.
- Pizzagalli F, Varga Z, Huber RD, Folkers G, Meier PJ, St-Pierre MV (2003) Identification of steroid sulfate transport processes in the human mammary gland. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3902–3912.
- Pop VJ, Brouwers EP, Vader HL, Vulsma T, van Baar AL, de Vijlder JJ (2003) Maternal hypothyroxinaemia during early pregnancy and subsequent child development: a 3-year follow-up study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 59:282–8.
- Pulkkinen MO (1961) Arylsulphatase and the hydrolysis of some steroid sulphates in developing organism and placenta. *Acta Physiol Scand Suppl* 52:1–92.
- Raftogianis R, Creveling C, Weinshilboum R, Weisz J (2000) Chapter 6: Estrogen metabolism by conjugation. *JNCI Monogr* 2000:113–124.
- Raimondi SG, Olivier NS, Patrio LC, Flury A (1989) Regulation of the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in tissue fragments and microsomes from human term placenta: kinetic analysis and inhibition by steroids. *J Steroid Biochem* 32:413–20.
- Rainey WE, Nakamura Y (2008) Regulation of the adrenal androgen biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108:281–6.
- Rainey WE, Rehman KS, Carr BR (2004) The human fetal adrenal: making adrenal androgens for placental estrogens. *Semin Reprod Med* 22:327–36.
- Rath VL, Verdugo D, Hemmerich S (2004) Sulfotransferase structural biology and inhibitor discovery. *Drug Discov Today* 9:1003–11.
- Ratiopharm - Beipackzettel HCT (2012) HCT-ratiopharm 25 mg Tabletten.
<http://www.ratiopharm.de/praeparate/alle-praeparate-a-z/praeparate/paeparatedaten/detail/backpid-114/buchstabe-h/pzn-1550375.html>.
Stand: 25.02.2014.
- Ratiopharm - Beipackzettel Torasemid (2011) Torasemid-ratiopharm 10 mg Tabletten.
<http://www.ratiopharm.de/praeparate/alle-praeparate-a-z/praeparate/paeparatedaten/detail/backpid-114/buchstabe-t/pzn-2471152.html>. Stand: 25.02.2014.

- Reed MJ, Purohit A, Woo LWL, Newman SP, Potter BVL (2005) Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition. *Endocr Rev* 26:171–202.
- Resnik R, Killam AP, Battaglia FC, Makowski EL, Meschia G (1974) The stimulation of uterine blood flow by various estrogens. *Endocrinology* 94:1192–6.
- Ritvos O (1988) Modulation of steroidogenesis in choriocarcinoma cells by cholera toxin, phorbol ester, epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Mol Cell Endocrinol* 59:125–33.
- Robertson HA, King GJ (1974) Plasma concentrations of progesterone, oestrone, oestradiol-17 β and of oestrone sulphate in the pig at implantation, during pregnancy and at parturition. *J Reprod Fertil* 40:133–41.
- Roth M, Obaidat A, Hagenbuch B (2012) OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol* 165:1260–87.
- Ryan KJ (1959a) Metabolism of C-16-oxygenated steroids by human placenta: the formation of estriol. *J Biol Chem* 234:2006–8.
- Ryan KJ (1959b) Biological aromatization of steroids. *J Biol Chem* 234:268–72.
- Salido EC, Yen PH, Barajas L, Shapiro LJ (1990) Steroid sulfatase expression in human placenta: immunocytochemistry and in situ hybridization study. *J Clin Endocrinol Metab* 70:1564–7.
- Samaras N, Samaras D, Frangos E, Forster A, Philippe J (2013) A review of age-related dehydroepiandrosterone decline and its association with well-known geriatric syndromes: is treatment beneficial? *Rejuvenation Res* 16:285–94.
- Samson M, Labrie F, Luu-The V (2009) Specific estradiol biosynthetic pathway in choriocarcinoma (JEG-3) cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol* 116:154–9.
- Sato K, Sugawara J, Sato T, Mizutamari H, Suzuki T, Ito A, Mikkaichi T, Onogawa T, Tanemoto M, Unno M, Abe T, Okamura K (2003) Expression of organic anion transporting polypeptide E (OATP-E) in human placenta. *Placenta* 24:144–148.
- Schiffer R, Neis M, Höller D, Rodríguez F, Geier A, Gartung C, Lammert F, Dreuw A, Zwadlo-Klarwasser G, Merk H, Jugert F, Baron JM (2003) Active influx transport is mediated by members of the organic anion transporting polypeptide family in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 120:285–91.
- Schuetz JD, Kauma S, Guzelian PS (1993) Identification of the fetal liver cytochrome CYP3A7 in human endometrium and placenta. *J Clin Invest* 92:1018–24.
- Schuler G, Ozalp GR, Hoffmann B, Harada N, Browne P, Conley AJ (2006) Reciprocal expression of 17 α -hydroxylase-C17,20-lyase and aromatase cytochrome P450 during bovine trophoblast differentiation: a two-cell system drives placental oestrogen synthesis. *Reproduction* 131:669–79.
- Schut HA, Townsley JD (1977) Oestrogen formation from C19 precursors in human choriocarcinoma in culture. *Acta Endocrinol (Copenh)* 84:633–41.

- Serrano MA, Macias RIR, Briz O, Monte MJ, Blazquez AG, Williamson C, Kubitz R, Marin JJG (2007) Expression in human trophoblast and choriocarcinoma cell lines, BeWo, Jeg-3 and JAr of genes involved in the hepatobiliary-like excretory function of the placenta. *Placenta* 28:107–17.
- Shneider BL, Dawson PA, Christie D-M, Hardikar W, Wong MH, Suchy FJ (1995) Cloning and molecular characterization of the ontogeny of a rat ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Clin Invest* 95:745–754.
- Siiteri PK (2005) The continuing saga of dehydroepiandrosterone (DHEA). *J Clin Endocrinol Metab* 90:3795–6.
- Siiteri PK, MacDonald PC (1966) Placental estrogen biosynthesis during human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 26:751–61.
- Siiteri PK, MacDonald PC (1963) The utilization of circulating dehydroisoandrosterone sulfate for estrogen synthesis during human pregnancy. *Steroids* 2:713–730.
- Sontas HB, Dokuzeylu B, Turna O, Ekici H (2009) Estrogen-induced myelotoxicity in dogs: A review. *Can Vet J* 50:1054–8.
- Splinter P-L, Lazaridis K-N, Dawson P-A, LaRusso N-F (2006) Cloning and expression of SLC10A4, a putative organic anion transport protein. *World J Gastroenterol* 12:6797–805.
- Stanway SJ, Purohit A, Woo LWL, Sufi S, Vigushin D, Ward R, Wilson RH, Stanczyk FZ, Dobbs N, Kulinskaya E, Elliott M, Potter BVL, Reed MJ, Coombes RC (2006) Phase I study of STX 64 (667 Coumate) in breast cancer patients: the first study of a steroid sulfatase inhibitor. *Clin Cancer Res* 12:1585–92.
- Steckelbroeck S, Nassen A, Ugele B, Ludwig M, Watzka M, Reissinger A, Clusmann H, Lütjohann D, Siekmann L, Klingmüller D, Hans VH (2004) Steroid sulfatase (STS) expression in the human temporal lobe: enzyme activity, mRNA expression and immunohistochemistry study. *J Neurochem* 89:403–17.
- Stevens JC, Hines RN, Gu C, Koukouritaki SB, Manro JR, Tandler PJ, Zaya MJ (2003) Developmental expression of the major human hepatic CYP3A enzymes. *J Pharmacol Exp Ther* 307:573–82.
- Stieger B, Hagenbuch B, Landmann L, Höchli M, Schroeder A, Meier PJ (1994) In situ localization of the hepatocytic Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver. *Gastroenterology* 107:1781–7.
- St-Pierre MV, Hagenbuch B, Ugele B, Meier PJ, Stallmach T (2002) Characterization of an organic anion-transporting polypeptide (OATP-B) in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1856–63.
- Strauss JF, Martinez F, Kiriakidou M (1996) Placental steroid hormone synthesis: unique features and unanswered questions. *Biol Reprod* 54:303–11.
- Sullivan MHF (2004) Endocrine cell lines from the placenta. *Mol Cell Endocrinol* 228:103–19.
- Suzuki T, Miki Y, Nakamura Y, Moriya T, Ito K, Ohuchi N, Sasano H (2005) Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 12:701–20.

- Tachampa K, Takeda M, Khamdang S, Noshiro-Kofuji R, Tsuda M, Jariyawat S, Fukutomi T, Sophasan S, Anzai N, Endou H (2008) Interactions of organic anion transporters and organic cation transporters with mycotoxins. *J Pharmacol Sci* 106:435–43.
- Tagawa N, Hidaka Y, Takano T, Shimaoka Y, Kobayashi Y, Amino N (2004) Serum concentrations of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate and their relation to cytokine production during and after normal pregnancy. *Clin Chim Acta* 340:187–193.
- Tamai I, Nezu J, Uchino H, Sai Y, Oku A, Shimane M, Tsuji A (2000) Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun* 273:251–60.
- Tobacman JK, Hinkhouse M, Khalkhali-Ellis Z (2002) Steroid sulfatase activity and expression in mammary myoepithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 81:65–8.
- Troisi R, Potischman N, Roberts JM, Harger G, Markovic N, Cole B, Lykins D, Siiteri P, Hoover RN (2003) Correlation of serum hormone concentrations in maternal and umbilical cord samples. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:452–6.
- Tulchinsky D, Osathanondh R, Belisle S, Ryan KJ (1977) Plasma estrone, estradiol, estriol and their precursors in pregnancies with anencephalic fetuses. *J Clin Endocrinol Metab* 45:1100–3.
- Ugele B, Bahn A, Rex-Haffner M (2008) Functional differences in steroid sulfate uptake of organic anion transporter 4 (OAT4) and organic anion transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1) in human placenta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 111:1–6.
- Ugele B, Simon S (1999) Uptake of dehydroepiandrosterone-3-sulfate by isolated trophoblasts from human term placenta, JEG-3, BeWo, Jar, BHK cells, and BHK cells transfected with human steroid sulfatase-cDNA. *J Steroid Biochem Mol Biol* 71:203–11.
- Ugele B, St-Pierre MV, Pihusch M, Bahn A, Hantschmann P (2003) Characterization and identification of steroid sulfate transporters of human placenta. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E390–8.
- Vähäkangas K, Myllynen P (2009) Drug transporters in the human blood-placental barrier. *Br J Pharmacol* 158:665–78.
- Verstegen-Onclin K, Verstegen J (2008) Endocrinology of pregnancy in the dog: a review. *Theriogenology* 70:291–9.
- Voutilainen R, Miller WL (1986) Developmental expression of genes for the steroidogenic enzymes P450scc (20,22-desmolase), P450c17 (17 α -hydroxylase/17,20-lyase), and P450c21 (21-hydroxylase) in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 63:1145–50.
- Warren JC, Timberlake CE (1962) Steroid sulfatase in the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 22:1148–1151.
- Watanabe S, Kang D-H, Feng L, Nakagawa T, Kanellis J, Lan H, Mazzali M, Johnson RJ (2002) Uric acid, hominoid evolution, and the pathogenesis of salt-sensitivity. *Hypertension* 40:355–360.

- Weinman SA (1997) Electrogenicity of Na(+)-coupled bile acid transporters. *Yale J Biol Med* 70:331–40.
- Weinman SA, Carruth MW, Dawson PA (1998) Bile acid uptake via the human apical sodium-bile acid cotransporter is electrogenic. *J Biol Chem* 273:34691–34695.
- Wong MH, Oelkers P, Dawson PA (1995) Identification of a mutation in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene that abolishes transport activity. *J Biol Chem* 270:27228–27234.
- Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, et al. (2012) Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 1:e00049.
- Zbella EA, Ileakis J, Scommegna A, Benveniste R (1986) Competitive studies with dehydroepiandrosterone sulfate and 16 alpha-hydroxydehydroepiandrosterone sulfate in cultured human choriocarcinoma JEG-3 cells: effect on estrone, 17 beta-estradiol, and estriol secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 63:751–7.

9 DANKSAGUNGEN

Nachdem nun das letzte Wort meiner Dissertation geschrieben ist, ist es an der Zeit mich bei allen Leuten zu bedanken, die mich auf dem Weg dorthin begleitet und diese Arbeit ermöglicht haben.

Mein herzlichster Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Ernst Petzinger für die Überlassung des Themas und die exzellente Betreuung. Ein ebenso großer Dank geht an Prof. Dr. Joachim Geyer, der das Projekt von Anfang an begleitete und mir mit wertvollen Tipps zur Seite stand. Tausend Dank an meinen Betreuer Dr. Gary Grosser, der mich wunderbar einarbeitete, vom ersten bis zum letzten Tag mit unglaublicher Geduld jederzeit ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und der mit seinem Wissen und seinen Ratschlägen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Ein großer Dank geht an das Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie, und -Embryologie, insbesondere an Prof. Dr. Martin Bergmann für die Beratung bei histologischen Fragestellungen, an Dr. Katja Hartmann für die Generierung der SOAT-Sonde für die In-situ-Hybridisierung, an Dr. Daniela Fietz, Britta Wapelhorst, Jutta Dern-Wieloch und Alexandra Hax für die Einarbeitung in die Immunhistochemie, In-situ-Hybridisierung und ins *Laser-assisted cell picking*.

Dem Steroidlabor der Abteilung für allgemeine Pädiatrie und Neonatologie des UKGM unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Wudy danke ich für die Kooperation, welche die LC-MS-MS-Messungen ermöglichte. Ein großer Dank geht an Alberto Sánchez Guijo und Dr. Michaela Hartmann für die Durchführung der Messungen.

Unserem Kooperationspartner, Dr. Bernhard Ugele danke ich vielmals für die fachliche Beratung.

Ein überaus großer Dank geht an die nettesten Kollegen, die man sich nur vorstellen kann. Mit ihnen fühlte ich mich vom ersten Tag an extrem wohl und gut aufgehoben. Ihre Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima ließen mich jeden Tag von neuem gerne ins Institut kommen. Bedanken möchte ich mich bei Dr. Barbara Döring dafür, dass sie jederzeit für Fragen bereitstand, bei Katharina Bakhaus, mit der ich zusammen das GGL besuchte und die mich in das Geheimnis des Western Blots einführte, der für mich anfangs Zauberei glich. Bei Dr. Jörg Alber, dessen Tür jederzeit für Fragen offenstand und der mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Bei Julia Aretz, mit der ich die In-situ-Hybridisierung durchführte und bei

meiner Bürokollegin Charlotte Straehle, die mit ihrem sonnigen Gemüt stets für gute Laune sorgte und mit der ich diverse versuchsbedingte Probleme diskutieren konnte. Ich danke meinen Semesterkollegen Clarissa Prinzing und Sabrina Elmshäuser, mit denen ich gemeinsam ins Laborleben startete. Außerdem danke ich Jana Bartholomeyzik, Jasmin Kranz, Stephanie Schmidt, Ebtisam Essid, Samy Abdallah und Osama Sammra, die ein angenehmes Arbeiten ermöglichten. Ein großer Dank geht an unsere wunderbaren technischen Assistenten, den Zellkulturkönig Klaus Schuh, unsere Laborfeen Regina Leidolf und Anita Neubauer sowie an den Experten für außergewöhnliche Fragestellungen Kurt Stumpf.

Dorothee von Schnakenburg danke ich für die Unterstützung bei bürokratischen Angelegenheiten und Christoph Zimmermann für die Hilfe bei technischen Angelegenheiten.

Meinen Korrekturlesern Dr. Gary Grosser, Sara Hintze und meinem Vater danke ich für das Durchhaltevermögen beim Durchlesen meiner Arbeit und die guten Kommentare. Sara Hintze danke ich zudem für die Beratung in allen Lebenslagen, die mir auch während schwierigerer Phasen der Doktorarbeit Motivation und Halt gab.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken für die uneingeschränkte Unterstützung!

Diese Arbeit wurde als Teil der Forschergruppe „Sulfatierte Steroide im Reproduktionsgeschehen“ FOR 1369 durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG gefördert.

Erklärung

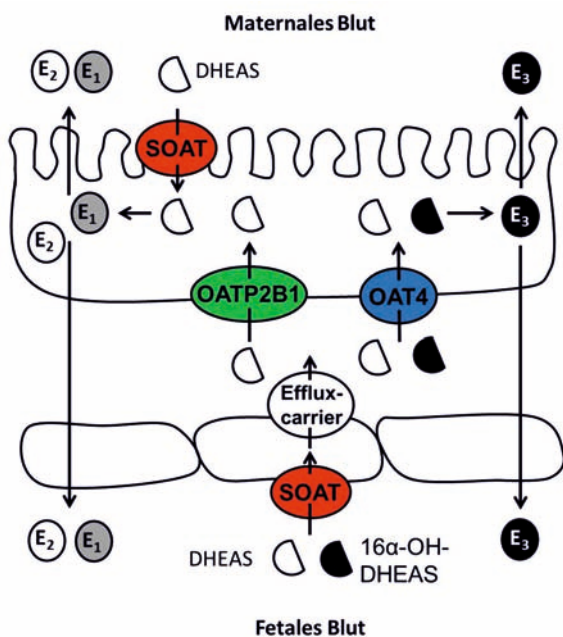
Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation

Die Rolle von Steroidsulfattransportern für die humane plazentare Östrogensynthese

selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Helene Schweigmann



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6206-4



9 17 8 3 8 3 5 11 9 6 2 0 6 4